

Aus dem Institut für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. H. Zahner

und

aus dem Zoologischen Institut der Universität zu Köln

Betreuer: Prof. Dr. E. Schierenberg

Vergleichende und experimentelle Untersuchungen zur
Embryonalentwicklung
von
freilebenden und parasitären
Nematoden

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Vera Ewald
geborene Lahl
Tierärztin aus Lippstadt

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. H. Zahner
Prof. Dr. E. Schierenberg

Tag der Disputation: 19.11.2007

Ihr habt den Weg vom Wurm zum Menschen gemacht,
und vieles ist in Euch noch Wurm.

(Also sprach Zarathustra, Friedrich W. Nietzsche)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
1 ABKÜRZUNGEN.....	9
2 GLOSSAR	10
2.1 Begriffe.....	10
2.2 Standardausrichtung und Bezeichnung der Raumachsen im Nematodenembryo.....	15
3 EINLEITUNG.....	16
4 PHYLOGENETISCHE EINORDNUNG DER UNTERSUCHTEN NEMATODEN-SPEZIES	19
5 LITERATURÜBERSICHT.....	24
5.1 Der Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i> – Grundlagen zur Biologie und zur Embryonalentwicklung	24
5.1.1 Der Organismus <i>C. elegans</i>	24
5.1.2 Die Embryonalentwicklung von <i>C. elegans</i>	29
5.2 Die untersuchten Nematodenspezies in der Literatur	38
5.2.1 <i>Diploscapter coronatus</i>	38
5.2.1.1 Morphologie und Biologie von <i>D. coronatus</i>	38
5.2.1.2 Embryologie von <i>D. coronatus</i>	39
5.2.2 Acrobeloiden	39
5.2.2.1 Morphologie und Biologie der Acrobeloiden	39
5.2.2.2 Embryologie der Acrobeloiden	40
5.2.3 Plectiden	43
5.2.3.1 Morphologie und Biologie der Plectiden	43
5.2.3.2 Embryologie der Plectiden	45
5.2.4 <i>Teratocephalus lirellus</i>	45
5.2.4.1 Morphologie und Biologie von <i>T. lirellus</i>	45
5.2.4.2 Embryologie von <i>T. lirellus</i>	46
5.2.5 <i>Heterakis spumosa</i>	46
5.2.5.1 Morphologie und Biologie von <i>H. spumosa</i>	46
5.2.5.2 Embryologie von <i>H. spumosa</i>	47
5.2.6 <i>Nematospiroides dubius</i> (= <i>Heligmosomoides polygyrus</i>).....	47
5.2.6.1 Morphologie und Biologie von <i>N. dubius</i>	47
5.2.6.2 Embryologie von <i>N. dubius</i>	48

5.2.7	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i> (= <i>Heligmosomum muris</i> , <i>Nippostrongylus muris</i>)	48
5.2.7.1	Morphologie und Biologie von <i>N. brasiliensis</i>	49
5.2.7.2	Embryologie von <i>N. brasiliensis</i>	49
5.2.8	<i>Trichinella spiralis</i>	49
5.2.8.1	Morphologie und Biologie von <i>T. spiralis</i>	49
5.2.8.2	Embryologie von <i>T. spiralis</i>	51
5.2.9	<i>Trichuris muris</i> (= <i>Trichocephalus muris</i>)	52
5.2.9.1	Morphologie und Biologie von <i>T. muris</i>	52
5.2.9.2	Embryologie von <i>T. muris</i>	54
6	MATERIAL UND METHODEN	55
6.1	Herkunft der Nematoden-Stämme	55
6.2	Medien zur Zucht freilebender Nematoden	56
6.2.1	<i>E. coli</i> -Anzucht (nach Brenner, 1974)	56
6.2.2	Herstellung von salzhaltigen Agarplatten (nach Brenner, 1974)	56
6.2.3	Herstellung von Agarplatten ohne Zugabe von Salzen (<i>Plectus</i> -Platten)	56
6.2.4	Reinigung mit Glutaraldehyd	57
6.3	Zucht freilebender Nematoden	57
6.4	Zucht und Isolierung parasitärer Nematoden	57
6.4.1	Anzucht und Isolierung von <i>H. spumosa</i>	58
6.4.2	Anzucht und Isolierung von <i>N. dubius</i>	58
6.4.3	Anzucht und Isolierung von <i>N. brasiliensis</i>	59
6.4.4	Anzucht und Isolierung von <i>T. spiralis</i>	59
6.4.5	Anzucht und Isolierung von <i>T. muris</i>	59
6.5	Feststellung des Fortpflanzungsmodus bei freilebenden Nematoden	59
6.6	Anfertigung von Präparaten	60
6.6.1	Beschichtung von Objektträgern	60
6.6.1.1	Herstellung von Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern (Cole & Schierenberg, 1986)	60
6.6.1.2	Herstellung von mit Agar-beschichteten Objektträgern	61
6.6.2	Gewinnung von Embryonen	61
6.6.3	Versiegelung der Präparate	62
6.7	Manipulationen von Embryonen	62
6.7.1	Ausgangslösungen für die Herstellung der Zellkulturmedien	62
6.7.1.1	Zellkulturwasser	62
6.7.1.2	Basen-Lösung	62
6.7.1.3	Inulin-Lösung	63
6.7.1.4	Galactose-Lösung	63

6.7.1.5 Salz-Stammlösung	63
6.7.1.6 Hühnereidotter	63
6.7.1.7 Fetal calf serum (FCS)	63
6.7.2 Zellkulturmedien	63
6.7.2.1 Trypanblau-Medium (TBM)	64
6.7.2.2 Embryonic growth medium (EGM) (Edgar, 1995)	64
6.7.3 Möglichkeiten der Lasermanipulation	65
6.7.3.1 Technische Daten und Aufbau des Lasers	65
6.7.3.2 Versuchsablauf bei subletaler Schädigung oder Laserablation einzelner Blastomeren	66
6.7.3.3 Eröffnung der Eihülle mit Hilfe des Lasermikrostrahls	67
6.7.3.4 Entfernung einzelner Blastomeren nach Eröffnung der Eihülle	67
6.8 Antikörpermarkierungen durch indirekte Immunfluoreszenz (verändert nach Strome, 1986)	68
6.8.1 Lösungen	68
6.8.1.1 PBS-Puffer (Brenner, 1974)	68
6.8.1.2 Waschpuffer	68
6.8.1.3 Antikörper	68
6.8.2 Ablauf der Antikörpermarkierung	69
6.9 Nachweis von Darmzelldifferenzierung	69
6.10 Mikroskopie, Lineageanalysen und Dokumentation	70
6.11 Datenerhebung und computergestützte Rekonstruktionen	71
6.12 Narkotisierung von Würmern mit 1-Phenoxy-2-propanol (PPX)	72
6.13 Variation der Entwicklungstemperatur bei <i>D. coronatus</i>	73

7 ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG FREILEBENDER NEMATODEN74

7.1 Morphologische Voruntersuchungen und embryologische Grundlagen freilebender Nematoden	74
7.1.1 <i>D. coronatus</i> als phylogenetisch naher Verwandter von <i>C. elegans</i>	74
7.1.2 Acrobeloiden als Vertreter der Cephalobiden	77
7.1.3 Einige Genera der Plectiden	77
7.1.4 <i>T. lirellus</i> – phylogenetischer Nachbar der Plectiden	81
7.2 Fortpflanzungsmodus	82
7.2.1 Fortpflanzungsmodus bei <i>D. coronatus</i>	82
7.2.2 Fortpflanzungsmodus bei Plectiden	83
7.2.3 Zusammenfassung Fortpflanzungsmodus <i>D. coronatus</i> und Plectiden	84
7.3 Meiose und Polkörperbildung bei parthenogenetischen Spezies	84
7.3.1 Polkörperbildung bei <i>D. coronatus</i>	84

7.3.2	Polkörperbildung bei „P. mekong“	86
7.3.3	Zusammenfassung Reduktionsteilung und Polkörperbildung bei parthenogenetischen Spezies	88
7.4	Eiaktivierung bei <i>D. coronatus</i> und „P. mekong“	89
7.4.1	Zusammenfassung Eiaktivierung bei <i>D. coronatus</i> und „P. mekong“	92
7.5	Etablierung der Raumachsen bei Nematodenembryonen.....	93
7.5.1	Ausbildung der anterior-posterior Achse.....	93
7.5.2	Ausbildung der dorso-ventralen Achse.....	95
7.5.2.1	Das rhomboide 4-Zellstadium bei Cephalobiden, Plectiden und <i>C. elegans</i>	95
7.5.2.2	Das lineare 4-Zellstadium als Übergangsform bei <i>D. coronatus</i> und <i>Protorhabditis</i> sp.	98
7.5.2.3	Kontrolle der Teilungsspindel in der AB-Zelle von <i>D. coronatus</i> und <i>C.</i> <i>elegans</i>	100
7.5.2.4	Auflösung des Übergangsstadiums: Das rhomboide 4-Zellstadium bei <i>D.</i> <i>coronatus</i> und <i>Protorhabditis</i> sp.	103
7.5.2.4.1	Kontrolle der EMS-ABp-Verschiebung bei <i>D. coronatus</i>	104
7.6	Frühe räumliche Musterbildung.....	106
7.6.1	Frühe räumliche Musterbildung bei <i>D. coronatus</i>	106
7.6.1.1	Variationen in der frühen räumlichen Musterbildung bei <i>D. coronatus</i>	106
7.6.1.2	Resultierendes Muster aller räumlichen Varianten von <i>D. coronatus</i>	108
7.6.2	Frühe räumliche Musterbildung bei Plectiden.....	109
7.7	Gastrulation und Darmzellendifferenzierung.....	110
7.7.1	Einwanderung der Darmvorläuferzellen bei <i>D. coronatus</i>	110
7.7.2	Einwanderung des Darmvorläufers bei Plectiden bei <i>Plectus</i> sp. und <i>Anaplectus</i> sp.	111
7.7.3	Spezifität der Gastrulation mit einer E-Zelle	113
7.7.4	Induzierte Gastrulation mit einer E-Zelle bei <i>C. elegans</i>	114
7.7.5	Darmzellendifferenzierung bei <i>D. coronatus</i> und „P. mekong“.....	116
7.7.5.1	Akkumulation von Acridinorange	116
7.7.5.2	Nachweisversuch der IVC mit dem Antikörper ICB4.....	117
7.8	Vergleich der bilateralen Symmetriebildung bei <i>C. elegans</i> und einigen parthenogenetischen Spezies	117
7.8.1	Ausbildung der bilateralen Symmetrie in den Zelllinien von <i>C. elegans</i>	117
7.8.2	Ausbildung der bilateralen Symmetrie in den Zelllinien von <i>D. coronatus</i> und <i>A. nanus</i>	119
7.8.3	Ausbildung der bilateralen Symmetrie in den Zelllinien von „P. mekong“ ...	122
7.8.3.1	Durchmischung von ABa- und ABp-Nachkommen im 8-Zellstadium	123
7.8.3.2	Herkunft und Symmetriebildung der AB-Zellen im anterior-ventralen Bereich	125
7.8.3.3	Symmetriebildung der AB-Zellen in den lateralen Bereichen.....	127

7.8.3.3.1	Ausbildung der rechten Seite des Embryos	127
7.8.3.3.2	Ausbildung der linken Seite des Embryos	129
7.8.3.4	Zusammenfassung Symmetriebildung der AB-Zellen in den antero-ventralen und ventro-lateralen Bereichen von „P. mekong“	130
7.9	Regulation	131
7.9.1	Regulationsfähigkeit bei „P. mekong“ und <i>D. coronatus</i>	131
8	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG PARASITÄRER NEMATODEN	134
8.1	Vorwort zur Embryonalentwicklung parasitärer Nematoden	134
8.2	<i>Heterakis spumosa</i>	135
8.2.1	Morphologie von <i>H. spumosa</i>	135
8.2.2	Embryologie von <i>H. spumosa</i>	136
8.3	<i>Nematospiroides dubius</i>	139
8.3.1	Morphologie von <i>N. dubius</i>	139
8.3.2	Embryologie von <i>N. dubius</i>	141
8.4	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	146
8.4.1	Morphologie von <i>N. brasiliensis</i>	146
8.4.2	Embryologie von <i>N. brasiliensis</i>	148
8.5	<i>Trichinella spiralis</i>	152
8.5.1	Morphologie von <i>T. spiralis</i>	152
8.5.2	Embryologie von <i>T. spiralis</i>	152
8.6	<i>Trichuris muris</i>	156
8.6.1	Morphologie von <i>T. muris</i>	156
8.6.2	Embryologie von <i>T. muris</i>	156
9	DISKUSSION.....	161
9.1	Besonderheiten der parthenogenetischen Reproduktion im Vergleich zum hermaphroditischen <i>C. elegans</i>	161
9.2	Unterschiede in der Etablierung der Zelllinien bei Vertretern verschiedener Claden	168
9.3	Unterschiede in der frühen Musterbildung und Zellspezifikation bei nahverwandten Nematodenspezies.....	171
9.3.1	Das lineare Stadium von <i>D. coronatus</i> und <i>Protorhabditis</i> sp.....	171
9.3.2	Die Reorganisation des linearen Stadiums bei <i>D. coronatus</i>	174
9.3.3	Varianten in der frühen räumlichen Musterbildung von <i>D. coronatus</i>	175
9.4	Gastrulation	176
9.4.1	Gastrulation ohne Beteiligung eines Blastocoels	176
9.4.2	Gastrulation mit Beteiligung eines Blastocoels.....	179

9.5	Etablierung der bilateralen Symmetrie	180
9.6	Regulation.....	182
9.7	Phylogenie	183
10	ZUSAMMENFASSUNG.....	186
11	SUMMARY	188
12	LITERATURVERZEICHNIS	190
13	ANHANG	205
13.1	Liste der verwendeten Spezies.....	205
ERKLÄRUNG		207
TEILPUBLIKATIONEN		209
DANKSAGUNG		211

1 Abkürzungen

Aqua dest.	destilliertes Wasser
DAPI	4`6-Diamidino-2-phenylindol
DIK	Differential-Interferenz-Kontrastmikroskopie
DTAF	Dichlorotriazin-Fluorescein
DTC	distal tip cell
EGM	Embryonic Growth Medium
FCS	Fetal Calf Serum
h	Stunde(n)
IVC	intestinal rectal valve cells
min	Minute(n)
MSP	major sperm protein
MTCO	microtubule organizing center
PCM-Gruppe	Plectiden, Chromadorida und Monhysterida
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCM-Gruppe	Plectiden, Chromadoriden, Monhysteriden
PPX	1-Phenoxy-2-propanol
s	Sekunde(n)
TBM	Trypanblau-Medium

2 Glossar

2.1 Begriffe

Amphid (Seitenorgan)	Chemorezeptor, paarweise seitlich am Vorderende gelegen
apomorph	evolutiv neu, abgeleitet. Apomorphien sind evolutive Neuheiten, die eine Stammart erworben und an ihre Nachkommen weitergegeben hat. Abgeleitet sind sie jeweils gegenüber einer ursprünglichen oder plesiomorphen Merkmalsvariante.
Apoptose	programmierter Zelltod
Blastocoel	innerer Hohlraum des frühen Embryos (Blastula), primäre Leibeshöhle
Blastomeren	erste, noch relativ große Zellen des Embryos, entstanden durch die ersten Teilungen der befruchteten Eizelle
Bulbus	charakteristische Auftreibung des Pharynx, beinhaltet den Klappenapparat
Bursa	männliche Klammerorgane zum Festhalten des Weibchens während der Paarung
cytoplasmatische Determinanten	Komponenten im Cytoplasma einer Eizelle, welche den Zellen, in die diese Komponenten gelangen, ein bestimmtes Entwicklungsschicksal zuweisen. Enthalten oft maternale mRNA, die in der Eizelle positionsspezifisch deponiert worden ist.
Darmvorläuferzelle(n)	Zelle(n), die das Darmschicksal tragen und im Verlauf der Gastrulation einwandern
Dotter	Baumaterial und Energieträger, die in der Eizelle gespeichert sind, überwiegend aus Phosphoproteinen und Phospholipiden bestehend
Embryo	Bezeichnung in der Nematologie für Entwicklungsstadien

	von der Befruchtung bis zum Schlupf
Epibolie	Gastrulationsbewegung Überwachsung, Ausdehnung einer äußeren Zellschicht über andere Zellschichten hinweg, die dadurch ins Inneere gelangen
Furchung	Serie rasch nacheinander ablaufender Zellteilungen, durch welche die Eizelle in immer kleiner werdende Tochterzellen zerlegt wird
Gastrulation	von gaster=Magen, Vorgang, durch den Zellen ins Innere gelangen, Einwanderung von Mesoderm- und Endodermvorläufern
gleichwertig	Zellen, die das selbe Entwicklungsschicksal tragen
gleichwertige Teilung	Teilung, aus der zwei gleichwertige Tochterzellen hervorgehen, z.B. Teilung von E in Ea und Ep
Gonade	Keimdrüse; Ovar oder Hoden; enthält Keimzellen
Gründerzelle	jeweilige Ausgangszelle für die Etablierung einer Zelllinie
Hermaphrodit, protandrisch	Zwitter, der zunächst im spätem Juvenilstadium Spermien und danach Eizellen produziert
Heterochronie	unterschiedliche relative Zeitdauer und/oder zeitlich gegeneinander verschobener Beginn einzelner Entwicklungsschritte bei verschiedenen Organismen, Änderung der Zeitprogramme in der Evolution
hologen, hologonisch	die gesamte Gonade ist mit Keimepithel ausgekleidet, die Keimzellen werden über die ganze Länge gebildet
homolog	Organe gleicher stammesgeschichtlicher Herkunft sind homolog. Sie brauchen sich funktionell nicht zu entsprechen.
Homoplasie	Ähnlichkeit von Merkmalen in zwei systematischen Gruppen, die sich nicht vom gleichen Merkmal ihres letzten gemeinsamen Vorfahren ableiten, sondern unabhängig voneinander entstanden sind.
Immigration	Gastrulationsbewegung, Einwanderung von Zellen aus einer Randlage in das Zentrum des Embryos

Induktion	Auslösen eines Entwicklungsvorgangs in einer Zelle durch eine benachbarte Zelle, die Induktionssubstanzen freisetzt, durch Induktion kann das ursprüngliche Entwicklungsprogramm modifiziert werden
Isthmus	charakteristische Verengung im Verlauf des Pharynx
Kardia	Ventilapparat, der den Pharynx mit dem Darm verbindet, auch Kardiaklappe oder Pharyngointestinalklappe
Keimbahn	Zelllinie, die von der befruchteten Eizelle P_0 über P_1 bis P_4 zu den Keimzellen für die nächste Generation (Z2 und Z3) führt
Klappenapparat	im Bulbus des Pharynx befindliche kutikuläre Struktur zur Zerkleinerung von Bakterien engl. grinder=„Zerreiber“
Kompetenz	Vermögen zu einer bestimmten Entwicklung; Vermögen, auf bestimmte entwicklungssteuernde Signale zu reagieren
konvergent	Konvergent sind ähnliche Merkmale bei nicht miteinander verwandten Arten, die im Lauf der Evolution aufgrund von Anpassung an eine ähnliche Funktion und ähnliche Umweltbedingungen ausgebildet wurden.
Kopf	Körperteil, vor der Basis des Stomas (Mundhöhle) gelegen
laterale Inhibition	Hemmung, die von einem Ort ausgehend auf die Nachbarschaft wirkt
longitudinal	der Länge nach, beim Embryo im anterior-posterior-Verlauf
maternal	mütterlich, von der Mutter ausgehend
Meiose	Reifeteilung, Reduktionsteilung. Im Verlauf der Meiose werden Polkörper abgegeben
monophyletisch	auf eine gemeinsame Stammart zurückgehend
Mosaikentwicklung	Vorstellung, die Entwicklung eines Embryos werde durch das Verteilungsmuster cytoplasmatischer Determinanten bestimmt
Musterbildung	Vorgänge, durch die reproduzierbare räumliche Muster verschieden differenzierter Zellen entstehen

Oogonien	unreife weibliche Keimzellen, diploid; durch Meiose und Dotteraufnahme gehen aus ihnen die Oocyten hervor
Oocyte	reife, befruchtungsfähige weibliche Keimzelle, bei <i>C. elegans</i> vor der Befruchtung in Diakinese der Prophase der Meiose I arretiert
Ovar	Eierstock
Parthenogenese	Fortpflanzung ohne Befruchtung
Pharynx (Oesophagus)	Teil des Verdauungsapparates, mit dem Mundrohr beginnender Abschnitt, der mit der Kardia in den Darm mündet
Phasmid	posterior gelegener Chemorezeptor der Secernentea
plesiomorph	evolutiv ursprünglich, gleich geblieben
Polkörper, erster, zweiter	meiotisches Produkt, wird im Zuge der Reduktion bei der meiotischen Teilung vom Genom abgeschnürt und in den Perivitellinraum ausgestoßen, beinhaltet DNA und wenig Cytoplasma
polyphyletisch	auf verschiedene Ursprünge zurückgehend
Rachis	axiale Struktur im Ovar mancher Nematodenspezies, die der Produktion des Cytoplasmas der Oocyten dient
Richtungsbezeichnungen	anterior=vorne, nach vorne gerichtet posterior=hinten, nach hinten gerichtet dorsal=rückenwärts gelegen ventral=bauchwärts gelegen, vgl. Kapitel 2.2
Soma, somatisch	(zum) Körper mit Ausnahme seiner Fortpflanzungszellen (gehörend)
Spermatheka	Abschnitt der weiblichen Gonade, der der Speicherung von Spermatocyten dient
Spicula	kutikularisierte, männliche Kopulationshilfsorgane (Begattungsstäbe), dorsal der Kloake gelegen
Synapomorphie	gemeinsamer Besitz eines abgeleiteten Merkmals bei

Schwestertaxa

Taxon	unterscheidbare und beschreibbare Gruppe von Organismen, die sich phylogenetisch nahestehen, und so eine Einheit der Natur abbilden sollen, ein Taxon trifft keine Aussage über die Größe oder den Rang der zusammengefaßten Organismen
transvers	quer zur Körperachse verlaufend
ungleichwertig (verschieden)	Zellen, die ein voneinander verschiedenes Entwicklungsschicksal tragen
ungleichwertige Teilung	Teilung, aus der zwei ungleichwertige Tochterzellen hervorgehen, z.B. Teilung von EMS in MS und E
Vas deferens	Samenleiter
Vorkerne	Bezeichnung des Eikerns und des Spermienkerns vor ihrer Fusion zum Zygotenkern
Vulva	äußerer Teil der weiblichen Gonade mit querschlitzförmiger Öffnung zum Ablegen der Eier
Zelldifferenzierung	(1) Unterschiedlichwerden von Zellen im Vergleich zueinander durch Divergenz der Entwicklungswege, (2) individuelle Zellentwicklung, die bei der ausgereiften (terminal differenzierten), voll funktionstauglichen Zellen endet
Zellkonstanz (Eutelia)	stets gleichbleibende Anzahl von Körperzellen bei verschiedenen Individuen einer Spezies
Zelllinie	Gesamtheit der Nachkommen einer Gründerzelle, Angehörige einer Zelllinie teilen sich in bestimmten Rhythmen synchron und äqual und bringen eine feste Zahl von Nachkommen mit invariantem Schicksal hervor.
Zellschicksal	Entwicklungsschicksal einer Zelle
Zellzyklus	Ereignisse von Zellteilung zu Zellteilung, gegliedert in die Phasen G1, S, G2 und Mitose

2.2 Standardausrichtung und Bezeichnung der Raumachsen im Nematodenembryo

Die Standardausrichtung eines Nematodenembryos mit den drei senkrecht aufeinander stehenden Raumachsen ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Anterior ist dabei immer nach links und ventral nach unten gerichtet.

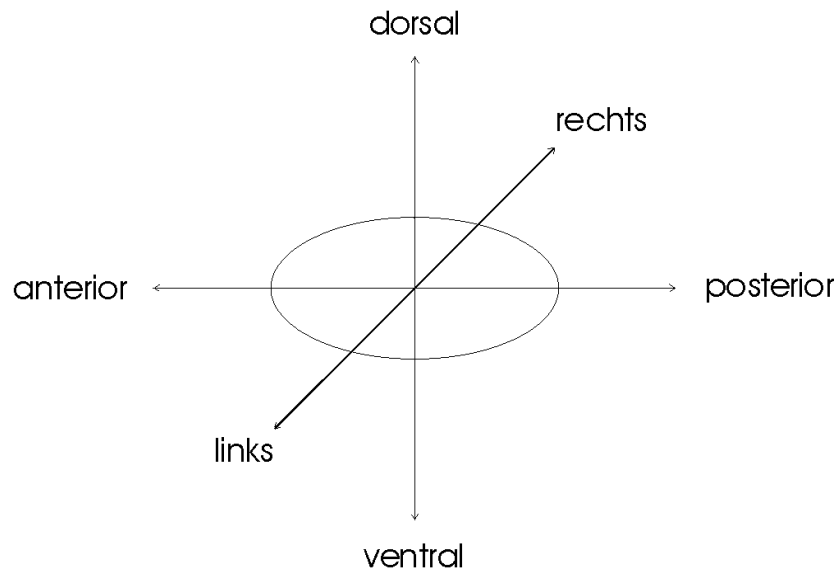


Abbildung 2.1: Standardausrichtung eines Nematodenembryos.

Die anterior-posterior Achse verläuft parallel zur Längsachse des Embryos. Ihre Pole markieren den späteren Kopf- und Schwanzbereich des Tieres.

Die dorsal-ventral Achse steht senkrecht auf der Längsachse und verläuft über eine der beiden kurzen Achsen des Embryos. Sie markiert die Bauch-Rücken-Ausdehnung. Im 4-Zellstadium definiert die Position der EMS-Zelle dabei die Bauchseite und die ABp-Zelle die Rückenseite.

Die links-rechts Achse steht wiederum senkrecht auf den anderen beiden Achsen und veranschaulicht die Dicke des Embryos. Befindet sich der Embryo in Standardausrichtung auf dem Objektträger, durchläuft man diese Ausdehnung, wenn man durch das Präparat fokussiert.

3 Einleitung

Die Untersuchung der Embryonalentwicklung von Nematoden nahm ihren Anfang vor gut 100 Jahren mit den Arbeiten hauptsächlich von Boveri (1887, 1892, 1899, 1910) und zur Strassen (1896) an *Ascaris megalocephala*. Aufgrund ihrer Beobachtungen und Experimente konnten die frühe Keimbahn-Soma-Trennung, die Konstanz der Keimbahn, die Zelleutelisie und die bei Nematoden sehr selten vorkommende Chromatindiminution erkannt und verstanden werden. Die Kontinuität der Chromosomen als individuelle Einheiten sowie die frühe Determination von Zellen basierend auf qualitativen Unterschieden im Cytoplasma sind weitere Aspekte der Embryonalentwicklung, die durch ihre Arbeiten aufgedeckt wurden.

Mit der Etablierung von *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus und der Analyse des gesamten Zellstammbaumes (Sulston & Horvitz, 1977; Kimble & Hirsh, 1979; Sulston *et al.*, 1983) explodierte in den letzten 30 Jahren auch das Wissen über entwicklungsbiologische Vorgänge bei *C. elegans*.

Da die frühen Zellteilungen und die räumliche Musterbildung sehr ähnlich wie die von *Ascaris* und den wenigen anderen untersuchten Nematoden sind, wurde angenommen, dass die Embryonalentwicklung insgesamt unter den Nematoden nur geringe Variationen aufweist. Man tendierte dazu, die an *Ascaris* und vor allem an *C. elegans* gewonnenen Erkenntnisse über deren Embryologie zu verallgemeinern und als allgemeingültig für Nematoden zu betrachten, ohne die Ergebnisse durch Untersuchung anderer Nematodenspezies überprüft zu haben.

Dies hat so in der Vergangenheit zu einigen offensichtlichen Fehleinschätzungen hinsichtlich der Bandbreite der Embryonalentwicklung bei den Nematoda geführt.

Die Verwendung von Modellorganismen und das Extrapolieren und Übertragen der mit ihrer Hilfe gewonnenen Erkenntnisse auf andere Nematodenspezies birgt gewisse Risiken (Bolker, 1995). So kann schon die unter dem Aspekt der einfachen Züchtung und Haltung getroffene Auswahl einer Spezies als Modellorganismus die Sicht auf das Entwicklungspotential eines Taxons verzerren. Es wäre z. B. möglich, dass Spezies mit kurzer Generationszeit und schneller Embryonalentwicklung einem bestimmten Selektionsdruck unterliegen, der auf sich langsam entwickelnden Spezies nicht in gleichem Maße lastet.

C. elegans als ein sich sehr schnell entwickelnder Nematode könnte so seine Regulationsfähigkeit zu Gunsten der schnellen und geradlinigen Entwicklung eingebüßt haben. Der von Wiegner und Schierenberg untersuchte *Acrobeloides nanus* entwickelt sich dagegen deutlich langsamer, zeigt jedoch ein hohes Maß an Regulationsfähigkeit (Wiegner, 1998; Wiegner & Schierenberg, 1998, 1999). *C. elegans* ist daher hinsichtlich bestimmter Fragestellungen wenig repräsentativ.

Diesem Problem kann nur durch weitere Untersuchungen von anderen Spezies, wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wurden, begegnet werden. Durch den Vergleich der Embryonalentwicklung verschiedener Spezies können der bestehende Kenntnisstand relativiert und vertieft werden, phylogenetische Positionierungen überdacht und die Vielfalt der Embryogenese erfasst werden. Das Wissen um die Entwicklung von Nicht-Modellorganismen ist auch hilfreich, um für eine bestimmte Fragestellung geeignete Spezies auswählen zu können.

Bis heute haben embryologische Untersuchungen jedoch nur an sehr wenigen Nematodenspezies und dort oft nur sehr oberflächlich stattgefunden. Meist beschränken sich solche Untersuchungen vor allem bei parasitären Spezies auf Larvalstadien oder umfassen nur einzelne embryologische Vorgänge. Die Angaben in Bezug auf das Entwicklungsstadium sind zu dem sehr grob und unspezifisch. Andere wichtige Prozesse in der Embryogenese finden oft gar keine Erwähnung. Eine Ausnahme stellen der oben genannte *Ascaris* sowie einige weitere kürzlich dokumentierte Beispiele von Spezies dar, die allerdings ziemlich nah mit *C. elegans* verwandt sind (Houthoofd *et al.*, 2003, 2006).

Recht eingehend wurden dagegen in den letzten Jahren an der Universität Köln einige freilebende Cephalobiden darunter *Acrobeloides nanus* und Rhabditiden untersucht. Trotz der relativ nahen Verwandtschaft zu *C. elegans* zeigen sich hier deutliche Unterschiede in der Embryonalentwicklung.

Im russischsprachigen Raum finden sich zu dem beschreibende Arbeiten an Nematodenspezies, die verwandtschaftlich sehr weit von *C. elegans* entfernt sind (Malakohov, 1994, 1998; Malakhov *et al.*, 1984) sowie eine Arbeit, die auch experimentelle Eingriffe einschließt (Voronov & Panchin, 1998). Auch hier treten eine Reihe von unerwarteten Abweichungen zu *C. elegans* auf.

Über eine lange Zeitspanne hinweg standen ausschließlich morphologische Daten zur Verfügung, um Verwandtschaftsbeziehungen unter Nematoden aufzustellen und sie phylogenetisch zu positionieren (Chitwood & Chitwood, 1950; Zell, 1993; Traunspurger, 2002). Eine besondere Schwierigkeit hierbei ist, zwischen Homologie und Konvergenz zu unterscheiden. Durch die in den letzten Jahren gewonnenen Daten auf molekularbiologischer Ebene (zum Beispiel Blaxter *et al.*, 1998; De Ley & Blaxter, 2002) ergaben sich zum Teil starke Abweichungen hinsichtlich phylogenetischer Abhängigkeiten und den Verwandtschaftsverhältnissen der Nematodenspezies untereinander. Als dritter Ansatz werden in dieser Arbeit Variationen in der Embryogenese verschiedener Spezies als potentielle, phylogenetische Marker überprüft.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Embryonalentwicklung verwandtschaftlich unterschiedlich weit von *C. elegans* entfernter Nematodenspezies zu untersuchen und zu vergleichen sowie die Eignung embryologischer Vorgänge als phylogenetische Marker zu überprüfen und Widersprüche hinsichtlich der Positionierung im Stammbaum aufzuklären. Dabei wird Bezug genommen auf die jeweilige phylogenetische Position in einem auf molekularen Daten basierenden Stammbaum (Blaxter *et al.*, 1998) und auf die Zugehörigkeit der jeweiligen

Spezies in die auf morphologischen Daten begründeten Klassen der Adenophorea bzw. Secernentea.

Es werden folgende Aspekte untersucht:

- die Morphologie
- die Fortpflanzungsweise
- die Reduktionsteilung
- Möglichkeiten der Eiaktivierung
- die Etablierung der Gründerzellen
- das Verhalten der frühen Keimbahn
- Ausbildung der Raumachsen und deren Kontrolle
- Variationen in der frühen räumlichen Musterbildung
- die Herkunft der Darmvorläuferzelle und die Einwanderung von dieser oder ihrer Nachkommen im Zuge der Gastrulation zusammen mit Aspekten der Darmzelldifferenzierung
- die Etablierung der bilateralen Symmetrie und die Regulationsfähigkeit

Kenntnisse über solche embryologischen Vorgänge vermitteln ebenfalls eine Vorstellung, welche Variationen mit einer Normalentwicklung noch vereinbar sind und liefern Informationen, die bei der Entwicklung von Nematiziden hilfreich sein können (Bernt *et al.*, 1998).

Zu den in dieser Arbeit untersuchten Nematoden zählen eng mit *C. elegans* verwandte Vertreter wie *Diploscapter coronatus* und *Protorhabditis* sp., *Nematospiroides dubius* und *Nippostrongylus brasiliensis*. Als zunehmend entferntere Verwandte werden der Cephalobide *Acrobeloides nanus* und ein weiterer Vertreter der selben Gattung („Herma-1“) sowie der Ascaride *Heterakis spumosa* und die nach morphologischen Kriterien die Grenze zwischen den Adenophorea und Secernentea markierende Plectiden mit dem nah mit ihnen verwandten *Teratocephalus lirellus* ausgewählt. Als sehr weit von *C. elegans* entfernte und den in der ehemaligen Sowjetunion untersuchten Spezies nahestehende Nematoden werden *Trichinella spiralis* und *Trichuris muris* in die Untersuchung einbezogen. Es befinden sich sowohl freilebende als auch parasitäre Vertreter unter den untersuchten Spezies.

4 Phylogenetische Einordnung der untersuchten Nematoden-Spezies

Die klassische Einteilung der Nematoden beruht auf morphologischen Kriterien. Zu den ersten und einflussreichsten Klassifikationen gehören die Einteilungen von Chitwood & Chitwood (1933) und Chitwood (1937). Sie schlugen eine Zweiteilung der Nematoda in Aphasmidia (später Adenophorea) und Phasmidia (später Secernentea) vor. Die Aufteilung berücksichtigte das Fehlen bzw. Vorhandensein von Phasmiden, Chemorezeptoren in der posterioren Region der Würmer. Auf der Basis der Morphologie erstellte phylogenetische Stammbäume weichen jedoch je nach Autor oft voneinander ab. Ursache kann zum Beispiel eine zu geringe Auflösung der morphologischen Strukturen mit der Lichtmikroskopie sein. Auch erschwert ein hoher Grad an Homoplasie unter den Nematoden eine Einteilung.

So gibt zum Beispiel Anderson (1992) an, dass die beiden Klassen Adenophorea und Secernentea monophyletisch sind und aus demselben Ursprung hervorgehen. Andere Analysen bezeichnen die Adenophorea als paraphyletisch und als Ursprung der Secernentea (Lorenzen, 1994; Malakhov, 1994; Adamson, 1987). Hierfür spricht, dass sich Adenophorea aus einer großen Bandbreite von Süßwassernematoden, Salzwassernematoden und Bodennematoden zusammensetzen, zu denen jedoch nur einige wenige Pflanzen- und Tierparasiten gehören. Secernentea dagegen sind hauptsächlich bodenbewohnend und beinhalten eine Vielzahl von parasitären und freilebenden Nematoden (Dorris *et al.*, 1999).

Obwohl die zweite Hypothese stärker befürwortet wird, bleibt die Verlässlichkeit von derartigen phylogenetischen Stammbäumen jedoch strittig.

Um Widersprüche und Unstimmigkeiten solcher auf morphologischen Kriterien basierenden Stammbäume aufzulösen, wurden in den letzten Jahren mehrere Analysen mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden durchgeführt (Aleshin *et al.*, 1998; Blaxter *et al.*, 1998, 2000). Um einen Überblick über die Verwandtschaftsverhältnisse der in dieser Arbeit untersuchten Nematodenspezies zu bekommen, wird auf die phylogenetische Positionierung von Blaxter *et al.* (1998, 2000) zurückgegriffen.

Blaxter *et al.* (1998) überprüften 53 Nematodenspezies aus allen großen Gruppen, freilebende wie parasitäre Arten, hinsichtlich ihrer Verwandtschaftsverhältnisse und Positionierung in klassischen Stammbäumen. Es wurde eine Datenbank aus den small subunit (SSU) Sequenzen der rDNA erstellt und unter Kriterien wie maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) und minimal evolution wurden mit Hilfe der Neighbour-joining-Methode (NJ) verschiedene Stammbäume generiert bzw. die Nematoden entsprechend positioniert.

Abbildung 4.1 zeigt einen Stammbaum, der nach der Maximum-parsimony-Methode die größte Wahrscheinlichkeit aufweist.

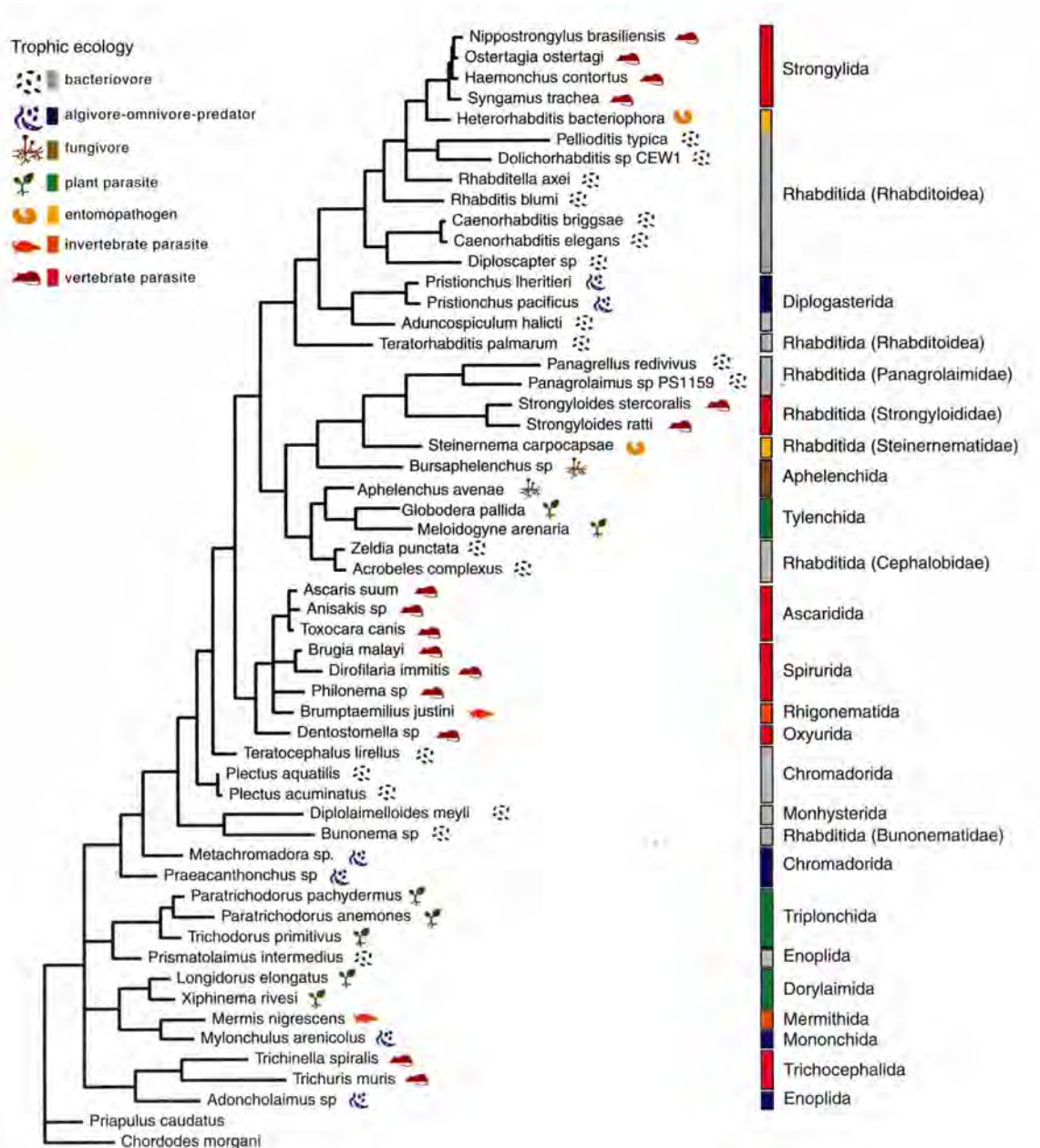


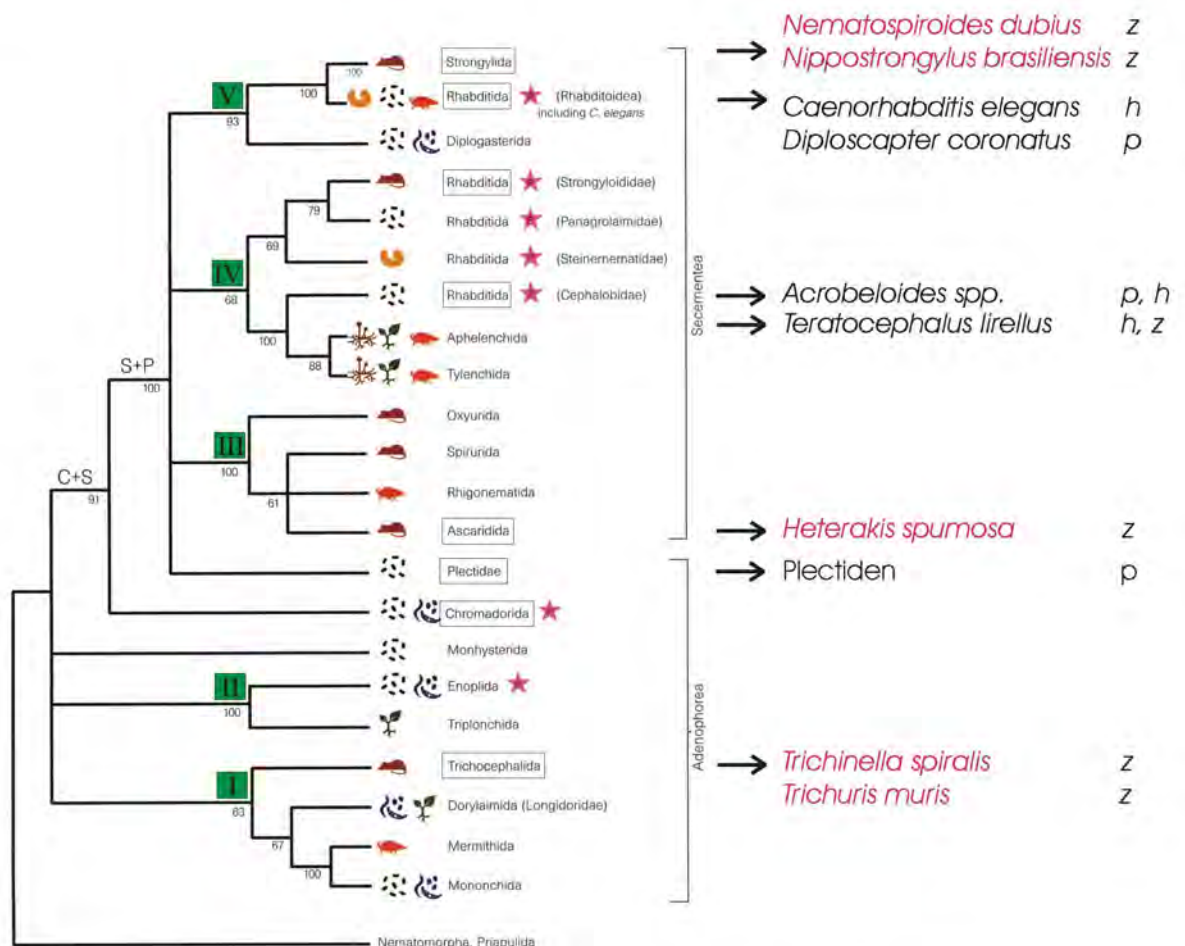
Abbildung 4.1: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf den Ergebnissen der Maximum-parsimony-Analyse, entnommen aus Blaxter *et al.*, 1998.

Verbindungen zwischen bisher separaten Taxa wurden aufgestellt und andere Taxa, von denen bis dahin angenommen wurde, dass sie eng miteinander verwandt seien, getrennt. Es konnte ein hoher Grad von konvergenter Entwicklung unter den Nematoden festgestellt werden.

Die Analysen von Blaxter *et al.* (1998) weisen auf einen paraphyletischen Ursprung der Adenophorea hin, welche die Vorfahren der Secernentea beinhalten. Unterstützt wird diese These durch fehlende Synapomorphien bei Adenophorea (Lorenzen, 1994) und durch andere morphologische Untersuchungen, aufgrund derer die Secernentea als monophyletischen Ursprungs angesehen werden und von den Adenophorea abstammen (Malakhov, 1994). Die klassische Unterteilung in Adenophorea und Secernentea konnte also

nicht unterstützt werden. Stattdessen scheinen die Secernentea aus den Chromadorida, einer Gruppe, die traditionell als eine der Hauptordnungen der Adenophorea angesehen wurde, hervorgegangen zu sein. Somit sind die Chromadorida selbst paraphyletisch.

Abbildung 4.2 zeigt den Gesamtkonsens, der die Ergebnisse aus den MP- und den NJ-Analysen zusammenfasst. Die in dieser Arbeit vorkommenden Spezies bzw. ihre nächsten in dem Stammbaum aufgeführten Verwandten sind hervorgehoben. Parasitäre Spezies sind rot hervorgehoben.



p=parthenogenetisch, h=hermaphroditisch, z=zweigeschlechtlich

Abbildung 4.2: Modifizierter phylogenetischer Stammbaum, Original entnommen aus Blaxter *et al.*, 1998. Rechts die in dieser Arbeit untersuchten Spezies.

Rot=parasitäre Spezies

Blaxter und seine Mitautoren teilen die Nematoden in fünf verschiedene Stämme (Claden) ein, wobei Clade I und Clade II rein adenophoreisch sind, sowie einige isoliert stehende, nicht einordbare Ordnungen.

Clade I fasst die vertebratenparasitierende Ordnung Trichocephalida, die insektenparasitierende Ordnung Mermithida, die pflanzenparasitierende Ordnung Dorylaimida und die freilebenden Mononchida zusammen. Zu dieser Clade gehören als

Trichocephalida auch die in dieser Arbeit untersuchten *Trichuris muris* und *Trichinella spiralis*.

Clade II vereint die pflanzenparasitierenden Triplonchida mit den freilebenden Enopliden.

Zwischen Clade II und Clade III sind als nicht zu einer Clade gehörend Plectidae, Chromadorida und die Monhysterida positioniert. Sie werden aufgrund in dieser Arbeit gemachter embryologischer Untersuchungen hier in der PCM-Gruppe zusammengefaßt. C + S bezeichnet die Chromadorida plus Secernentea. S + P kennzeichnet die Secernentea plus Plectidae. Die Chromadoriden werden als eine paraphyletische Gruppe an der Basis der Secernentea betrachtet. Die Plectidae, zu den Chromadoriden gehörend, scheinen wesentlich mit den Secernentea verknüpft zu sein. Sie scheinen ein lebender Vertreter der Gruppe zu sein, von der die Radiation der Secernentea begann. Zu den Plectidae gehören alle untersuchten *Plectus*- und *Anaplectus*-Spezies sowie *Tylocephalus auriculatus* und *Ereptonema arcticum*. *Teratocephalus lirellus* ist der nächste Nachbar zu den beiden in Abbildung 4.1 aufgelisteten *Plectus*-Spezies.

Die meisten Taxonomien teilen die Secernentea in neun Ordnungen ein. Blaxter *et al.* (1998) hingegen konnten nur drei Klassen, Clade III bis V, identifizieren, die nur Secercentea beherbergen. Anders als bei klassischen Einteilungen sind parasitische Spezies in allen drei dieser Claden vertreten.

Obwohl allgemein angenommen wird, dass Parasiten aus freilebenden Vorfahren hervorgegangen sind, ist deren genauer Ursprung und jeweils freilebendes Schwestertaxon unbekannt. Es wurde angeregt, alle parasitischen Nematoden in einer Subklasse zusammenzufassen, da sie hinreichend genug miteinander verwandt seien (Lorenzen, 1994).

Blaxter *et al.* (1998) hingegen gehen aufgrund ihrer bootstrap-Analysen von mehreren voneinander unabhängigen Ursprüngen von Parasitismus im Phylum Nematoda aus. In Übereinstimmung mit der Ansicht, dass Vertebratenparasiten von arthropodischen Parasiten abstammen, ist jede der secernentischen vertebratenparasitischen Claden mit arthropodenparasitischen oder arthropodenpathogenen Taxa assoziiert. Für den Parasitismus bei Vertebraten werden mindestens vier Ursprünge angenommen, während der Pflanzenparasitismus dreimal unabhängig voneinander entstanden sein soll.

Clade III vereint vertebratenparasitische und insektenparasitierende Taxa der Ordnungen Ascaridida, Spirurida, Oxyurida und Rhigonematida. In dieser Arbeit wurde *Heterakis spumosa* als Vertreter der Ascaridida untersucht. Die nächsten freilebenden Verwandten zu den in dieser Clade aufgeführten Parasiten sind die Plectidae und Teratocephalidae.

Die aus anderen Taxonomien bekannte Ordnung Rhabditida scheint paraphyletischen Ursprungs zu sein, da als rhabditid bezeichnete Taxa sowohl in Clade IV als auch in Clade V zu finden sind. Beide Claden enthalten jeweils auch parasitische Ordnungen.

Clade IV gruppiert die pflanzenparasitischen Ordnungen Tylenchida und Aphelenchida mit dem vertebratenparasitischen Genus *Strongyloides*, dem insektenpathogenen Genus *Steinernema* und freilebenden Vertretern der rhabditiden Familien Cephalobidae und

Panagrolaimidae. Somit gehören die in dieser Arbeit verwendeten Spezies *Acrobelloides nanus* und der hermaphroditische Acrobelloide PS 1146 („Herma-1“) zu dieser Clade.

Clade V fasst *C. elegans*, weitere Mitglieder der Subordnung Rhabditina mit der vertebratenparasitischen Ordnung Strongylida, dem insektenpathogenen Genus *Heterorhabditis* und der Ordnung Diplogasterida zusammen. *Diploscapter coronatus* als nächster Nachbar von *C. elegans*, *Protorhabditis* sp. und *Nippostrongylus brasiliensis* (*Heligmosomum muris*, *Nippostrongylus muris*) sowie *Nematospiroides dubius* (*Heligmosomoides polygyrus*) als Vertreter der Strongylida gehören somit zu Clade V.

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten entwicklungsbiologischen Untersuchungen wurde der Stammbaum von Blaxter *et al.* (Abbildung 4.2) etwas modifiziert (Schierenberg & Lahl, 2004) (Abbildung 9.3).

Kürzlich wurde mit einer deutlich erweiterten Datenbasis von ribosomalen DNA-Sequenzen ein phylogenetischer Stammbaum der Nematoden vorgestellt, der anstelle von 5 Claden 12 Claden postuliert, aber ansonsten keine dramatischen Umstellungen des hier verwendeten Stammbaums beinhaltet (Holterman *et al.*, 2006).

5 Literaturübersicht

5.1 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* – Grundlagen zur Biologie und zur Embryonalentwicklung

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* wurde 1899 erstmals von Maupas beschrieben. Durch die bahnbrechende Arbeit „The genetics of *Caenorhabditis elegans*“ von Sydney Brenner (1974) wurde *C. elegans* als Modellorganismus in der Zellbiologie und Entwicklungsbiologie etabliert. Inzwischen wurde der gesamte Zellstammbaum analysiert (Sulston & Horvitz, 1977; Kimble & Hirsh, 1979; Sulston *et al.*, 1983), und seit 1998 ist das Genom vollständig sequenziert.

2002 erhielten Brenner, Horvitz und Sulston den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für ihre Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der genetischen Regulierung der Organentwicklung und des programmierten Zellsterbens.

Gemäß Blaxter *et al.* 1998 (Abbildung 4.2) wird *C. elegans* zu Clade V des auf molekularen Daten basierenden phylogenetischen Stammbaums zugeordnet und gehört somit zu der Klasse der Secernentea, Ordnung Rhabditida, Unterordnung Rhabditina.

5.1.1 Der Organismus *C. elegans*

Caenorhabditis elegans ist ein freilebender Bodenbewohner. Er ernährt sich von Bakterien und ist ungefähr 1 mm groß. Die Lebenserwartung beträgt etwa drei Wochen. Sein Bauplan, hier von außen nach innen dargestellt, ist relativ einfach (Abbildung 5.1).

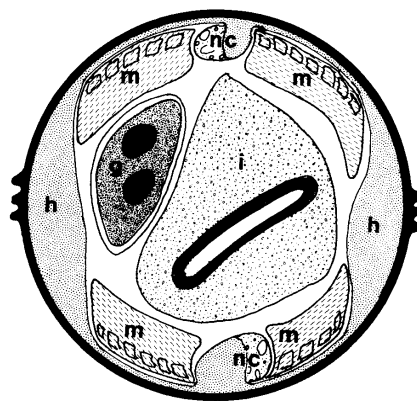


Abbildung 5.1: Querschnitt durch *Caenorhabditis elegans*, entnommen aus Wood, 1988: (g) Gonade, (h) hypodermale Leiste, (i) Darm, (m) Mukulatur, (nc) Nervenstrang.

Der Wurm ist umgeben von einer dünnen Kutikula, die von den darunter liegenden Hypodermiszellen ausgeschieden wird. Sie besteht aus mehreren Schichten Kollagen und

assoziierten Proteinen. Kutikuläre Alae verlaufen lateral entlang des Körpers und ermöglichen das Kriechen auf festem Untergrund.

Vier längs verlaufende Körpermuskelstränge, zwei dorsale und zwei ventrale, ermöglichen die typische schlängelnde Fortbewegung durch Deformation der elastischen Kutikula, wobei der Turgor als Antagonist wirkt. Neben der Längsmuskulatur existieren noch einige spezialisierte Muskelzellen.

Das Verdauungssystem (Abbildung 5.2) setzt sich aus dem anterior gelegenen Pharynx, dem eigentlichen Darm und dem Rectum zusammen. Der Pharynx beginnt mit einem kurzen Mundrohr, an das sich der lang gestreckte Procorpus mit seinem posterior gelegenen, aufgetriebenen Metacorpus anschließt. Im anschließenden Isthmus verengt sich der Pharynx und endet schließlich mit einem terminalen Bulbus, der einen als Grinder bezeichneten, kutikulären Klappenapparat enthält. Über eine pharyngeal-intestinale Klappe schließt der Darm an den Pharynx an. Auch das auf den Darm folgende Rectum wird durch eine bei *C. elegans* aus zwei Zellen bestehende intestinal-rectale Klappe getrennt.

Das auf Höhe des terminalen Bulbus gelegene Exkretionssystem dient der Osmoregulation und besteht aus einer großen Exkretionszelle, einer Duktuszelle und einer Porenzelle. Eine Drüsenzelle ist mit den beiden erstgenannten Zellen verbunden. Ihre beiden longitudinalen Ausläufer durchziehen fast die gesamte Länge des Tieres.

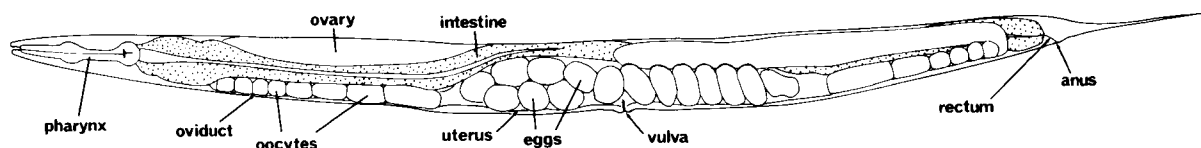


Abbildung 5.2: Längsschnitt durch einen hermaphroditischen *C. elegans*, entnommen aus Wood, 1988.

Das Nervensystem umfaßt beim adulten Tier 302 Zellen. Viele Nervenzellen liegen als Ganglien gebündelt vor. Die Kopfganglien sind die auffälligsten unter ihnen. Sie sind als Ring um den Pharynx herum angeordnet (circumpharyngialer Nervenring) und innervieren auch die sich rostral befindenden Kopfsinnesorgane. Vier Nervenstränge, ein ventraler, ein dorsaler und zwei laterale, verlaufen längs des Körpers. Der Hauptnervenstrang entlang der Bauchseite setzt sich aus Motoneuronen für die Innervation der Körpermuskeln zusammen. Primitive Sinnesorgane dienen als Mechano-, Thermo- und Chemorezeptoren.

Die flüssigkeitsgefüllte Leibeshöhle (Pseudocölon) umfaßt neben dem Verdauungstrakt auch die Gonade sowie einige weitere spezialisierte Zelltypen.

C. elegans ist ein diploider, sich selbstbefruchtender, protandrischer Hermaphrodit. Selten entstehen durch non-disjunction Männchen (0,05%). Anders als Hermaphroditen haben sie nur ein Geschlechtschromosom (X0 statt XX) und sind etwas kleiner.

Der adulte Hermaphrodit besitzt zwei gebogene Gonadenschläuche (Abbildung 5.2, Abbildung 5.3). Sie verlaufen vom Zentrum des Tieres ausgehend nach anterior bzw. nach posterior, schlagen nach der Hälfte der Länge um und enden in einer distalen Spitze mit je

einer distal tip cell (DTC). Jeder Arm besteht aus einem Ovar, einem Ovidukt, einer Spermatheka und einem Uterus. Beide Gonadenschläuche münden in die in der Mitte gelegene Vulva, durch die die Eier abgelegt werden.

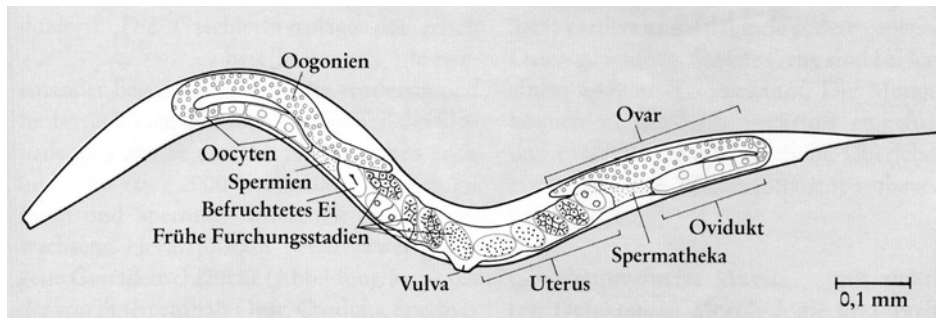


Abbildung 5.3: Längsschnitt durch die Gonade eines hermaphroditischen *C. elegans*, entnommen aus Schierenberg & Cassada, 1986

Die Keimzellen der distalen Region jedes Armes stehen unter dem Einfluß der distal tip cell, die eine Substanz zur Aufrechterhaltung der Mitose freisetzt. Mit zunehmender Entfernung der Keimzellen von dieser Region nimmt die Konzentration dieser Substanz ab, so dass die Keimzellen in die Meiose eintreten können.

Während ihrer Passage durch den Gonadenschlauch reifen die Keimzellen und die einzelnen Kerne werden fast komplett von Membranen umschlossen, die die Masse der Nuclei in einzelne Oocyten unterteilen. Die Zellularisation erfolgt jedoch noch nicht vollständig, sondern jede Oocyte behält Kontakt zu einer als Rachis bezeichneten, zentral verlaufenden Struktur des Gonadenschlauches, die das Cytoplasma der Oocyten aus Lipidtröpfchen und anderen cytoplasmatischen Komponenten produziert. Diese Verbindung bleibt bis kurz vor der Befruchtung bestehen.

Reife Oocyten passieren schließlich die Spermatheka und werden entweder von eigenen Spermien oder denen des Männchens befruchtet. Während der ersten 30 min nach der Befruchtung bildet die Zygote im Uterus die Eischale aus. Sie besteht aus der inneren Vitellinmembran, der mittleren, chitinösen Schicht und einer äußeren Schicht aus Lipiden, Kollagen und Proteinen. Ungefähr 3 h nach der Befruchtung wird das Ei etwa zum Zeitpunkt der Gastrulation durch die Vulva abgelegt.

Männchen haben nur eine einarmige, gebogene Gonade (Abbildung 5.4). Der Bereich der Hoden erstreckt sich von der distalen Spitze über die Biegung im Gonadenschlauch bis ungefähr zum Zentrum des Tieres. Die Mitoseaktivität wird wie beim Hermaphroditen durch den Einfluß von distal tip cells in der näheren Umgebung aufrechterhalten. Allerdings besitzt der Gonadenschlauch des Männchens zwei DTC. Nuclei außerhalb dieses Bereiches treten in die Meiose ein. Wie beim Hermaphroditen gruppieren sie sich um eine zentral gelegene Rachis, von der sie Cytoplasma aufnehmen. Im anschließenden Samenbläschen beenden die Spermatocyten die beiden meiotischen Teilungen und werden dort als reife Spermatiden bis zur Ejakulation gespeichert. Bei einer Ejakulation werden die amöboiden, geißellosen Spermien durch das Vas deferens, das mit dem Darm zusammen in der Kloake mündet, transportiert.

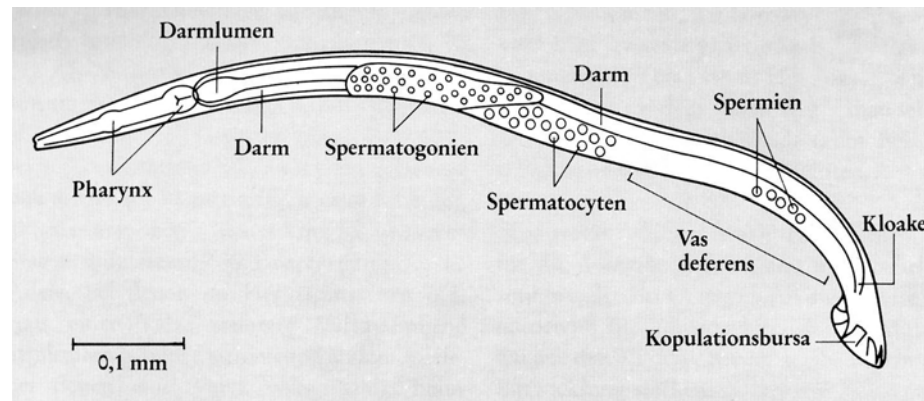


Abbildung 5.4: Längsschnitt durch die Gonade eines männlichen *C. elegans*, entnommen aus Schierenberg & Cassada, 1986

Dem Schwanz des Männchens fehlt das spitz zulaufende Schwanzende des Hermaphroditen. Stattdessen besitzt das Männchen ausladende Kopulationsorgane (Abbildung 5.4). Im Fächer (fan) der Kopulationsbursa verlaufen als Strahlen (rays) bezeichnete sensorische Rezeptoren. Zusätzliche Rezeptoren befinden sich anterior und posterior der im Zentrum des Fächers mündenden Kloake. Das Proctodeum enthält zwei Spicula sowie die Muskeln zum Ein- und Ausfahren der Spicula. Die Spicula werden während der Kopulation in die Vulva des Hermaphroditen eingeführt, um die Samenübertragung zu erleichtern. Beim Ausfahren werden die Spicula durch eine Art Führungsschiene (Gubernaculum) aus der Kloake hinausgeschoben.

Die Zahl der Nachkommen wird durch die Spermienanzahl begrenzt. Wenn keine Spermien mehr da sind, produziert der unbefruchtete Hermaphrodit noch ungefähr vier weitere Tage Oocyten und legt einen Tag lang unbefruchtete Oocyten ab. Männchen können lebenslang Spermien produzieren.

Werden Hermaphroditen mit Männchen gekreuzt, werden statt der üblichen etwa 300 Eier in vier Tagen bis zu 1000 Eier gelegt. Dies ist auf den Wegfall des bei Selbstbefruchtung begrenzenden Faktors der Spermienanzahl zurückzuführen. Zusätzlich erhöht sich bei einer solchen Kreuzung die Männchendichte in einer Population, da sich die Hälfte der fremdbefruchteten Eier wieder zu Männchen entwickelt. Hingegen produzieren Hermaphroditen, die nicht zur Paarung gelangen, wieder fast nur Hermaphroditen als Nachkommen.

Die Eier von *C. elegans* beginnen bereits im Muttertier mit ihrer Entwicklung und werden ungefähr im 50-Zellstadium abgelegt. Durch experimentelles Freisetzen der Eier, welches noch vor der Vorkernverschmelzung möglich ist, kann die Embryogenese jedoch auch vollständig außerhalb des Elterntieres beobachtet werden. Ihr widmet sich ein eigenes kurzes Übersichts-kapitel (Kapitel 5.1.2).

12 h (25° C) nach der Befruchtung schlüpft die L₁ (ca. 0,2 mm groß) mit 558 Zellen beim Hermaphroditen und 560 Zellen beim Männchen. Abgesehen von einer noch nicht entwickelten Gonade und einer fehlenden Geschlechtsöffnung ähnelt sie bereits dem Adulten. Die Gonadenanlage besteht zu diesem Zeitpunkt aus vier hintereinanderliegenden

Zellen. Die vorderste und hinterste Zelle (Z1 und Z4) bilden als MS-Nachkommen den somatischen Teil, die beiden mittleren Zellen Z2 und Z3 stellen als P₄-Töchter den generativen Teil der Gonade dar. Aus ihr entstehen im Folgenden etwa 2000 Keimzellen, die sich zu Eiern und Spermien differenzieren. Etwa 7 h nach dem Schlupf beginnen die beiden Keimzellen mit ihrer Proliferation, die sie bis ins Erwachsenenalter fortsetzen.

Einhergehend mit einer Massezunahme um das 100-fache entwickelt sich die L₁ über vier Juvenilstadien (L₁-L₄) zu einem adulten Tier. Der gesamte Lebenszyklus ist in Abbildung 5.5 dargestellt.

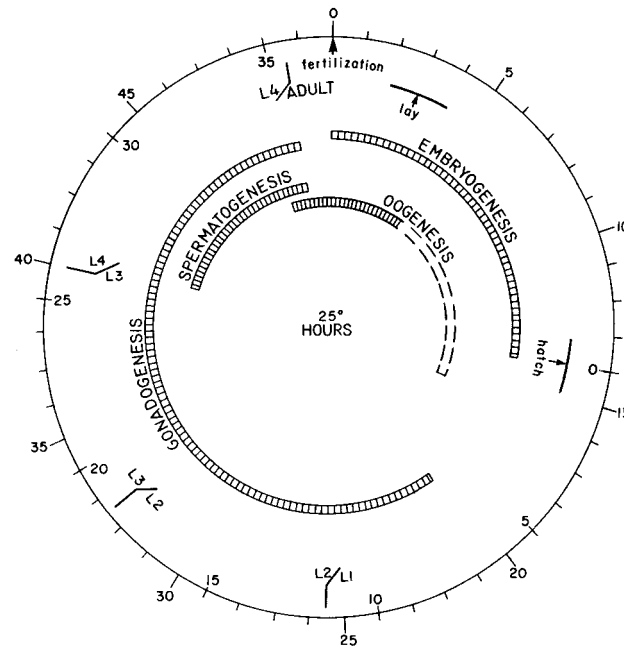


Abbildung 5.5: Lebenszyklus von *C. elegans*, entnommen aus Wood, 1988. Zahlen außerhalb des Kreises geben die vergangenen Stunden nach der Befruchtung bei 25° C an. Zahlen innerhalb des Kreises geben die ungefähre Zeit nach dem Schlupf an.

Die Gonadogenese wird während des L₄-Stadiums abgeschlossen. Die Verbindung der Gonade mit der entstehenden Vulva beim Hermaphroditen bzw. die Morphogenese des männlichen Schwanzes finden in dieser Phase statt. Die Keimzellen sind inzwischen in die Meiose eingetreten und differenzieren sich zu Spermien, die in der Spermatheka des Hermaphroditen gespeichert werden. Zum Zeitpunkt der Häutung der L₄ wird von Spermienproduktion auf Oocytenproduktion umgestellt. Zur gleichen Zeit öffnet sich die Vulva.

Der Hermaphrodit besitzt als Adulter 959, das Männchen 1031 somatische Zellen. Innerhalb von zwei Tagen hat sich so das befruchtete Ei zum Adulten entwickelt.

Unter schlechten Bedingungen kann sich nach der zweiten Häutung statt der L₃ eine Dauerlarve entwickeln. Sie hat eine widerstandsfähigere Kutikula, ist inaktiv und lang gestreckt und kann so mehrere Monate überleben. Herrschen wieder bessere Bedingungen, wird die normale Entwicklung fortgesetzt.

Die Forschung an *C. elegans* hat in den letzten 30 Jahren erheblich an Bedeutung gewonnen. *C. elegans* ist für die unterschiedlichsten Fragestellungen und Methoden geeignet und ist über die Jahre zu einem vielbeachteten und erforschten Modellorganismus avanciert.

Aufgrund seiner einfachen und billigen Kultivierung auf Platten ohne Wirtsabhängigkeit kann er mit sehr einfachen Mitteln im Labor gezüchtet werden. Kurze Generations- und Entwicklungszeiten zusammen mit der hermaphroditischen Fortpflanzungsweise erlauben einen fast uneingeschränkten Zugriff auf für verschiedene Fragestellungen geeignete Entwicklungsstadien.

Invariante Zellstammbäume (Abbildung 5.8) verbunden mit einer geringen Zellzahl, haben dazu geführt, dass der Werdegang jeder einzelnen Zelle zu jedem Zeitpunkt in der Entwicklung nachvollzogen werden konnte.

Für mikroskopische Studien ist es besonders vorteilhaft, dass Kutikula und Eihülle transparent sind und eine normale Entwicklung auch außerhalb des Elterntieres stattfindet.

Durch seine fakultativ diözische Fortpflanzungsweise (Männchen und Hermaphroditen) entstehen nach Mutagenese aufgrund von Selbstbefruchtung nach zwei Generationen automatisch homozygot mutante Nachkommen, so dass Kreuzungen nicht nötig werden. Die Mutanten können anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und damit beliebig lange aufbewahrt werden.

Nicht zuletzt begründet sich die Popularität, *C. elegans* als Modellorganismus zu verwenden, auf der großen Menge an verfügbaren Daten, die in den letzten Jahrzehnten gewonnen werden konnten.

Trotz der Vielzahl des für den Entwicklungsbiologen wichtigen Vorteile birgt *C. elegans* als Modellorganismus jedoch auch einige Nachteile. Dazu zählt wegen der geringen Größe und der Hülle der Eier die Schwierigkeit der Mikroinjektion in Zellkerne. Auch sind Gewebeisolierung und Elektrophysiologie wegen der Größe des Organismus recht problematisch. Gewebe- und Organkulturen, mit denen man diese Hindernisse überwinden könnte, existieren bisher noch nicht. Zudem fehlen bei *C. elegans* eine Vielzahl von äußeren Strukturen und Farbmarkierungen, wie sie bei *Drosophila melanogaster* existieren.

5.1.2 Die Embryonalentwicklung von *C. elegans*

Die Embryogenese von *C. elegans* lässt sich in eine Proliferationsphase (Zellvermehrung) und eine gestaltgebende Morphogenesephase unterteilen und dauert von der Befruchtung bis zum Schlupf ungefähr 14 h (22° C).

Alle Keimzellen entstehen aus den beiden Keimzellvorläufern Z2 und Z3, die aus einer gleichwertigen Teilung als Töchter von P₄ hervorgegangen sind. Die Keimzellbildung wird von zwei somatischen Zellen, den distal tip cells, situiert an der Gonadenspitze, gesteuert. Zunächst findet eine kurze Phase der Spermienproduktion statt, bevor das Tier etwa zum Zeitpunkt der Häutung der L₄ mit der Oocytenproduktion beginnt. Unter dem Einfluß der DTC teilen sich Oogonien mitotisch. Jenseits ihres Einflussbereiches, noch vor dem Übergang

vom distalen zum proximalen Gonadenarm, treten die Oogonien in die Meiose ein (Kimble & White, 1981). Die Kerne wachsen dabei durch Aufnahme von Cytoplasma aus absterbenden Keimzellen und von Dottergranula zu großen, befruchtungsfähigen Oocyten heran. Im proximalen, dem Uterus zugewandten Abschnitt des Gonadenschlauches, sind die sich vergrößernden Oocyten aufgereiht. Ihre Kerne sind in der Diakinese der Prophase der Meiose I arretiert.

Die Oocyten werden einzeln in die Spermatheka geschoben und dort befruchtet.

Durch das vom Spermium stammende major sperm protein (MSP) wird die meiotische Reifung der Oocyte induziert, so dass die zuvor arretierte Meiose fortgeführt werden kann. Eine weitere Funktion des MSP in der Oocyte ist die Kontraktion der ovariellen Muskulatur, die für die Eiablage nötig ist. Im Spermium ist es das zentrale Element für eine aktinunabhängige Bewegung. Im Verlauf der meiotischen Reifung kommt es zu einem Zusammenbruch der Kernhülle, zur Neuordnung des corticalen Cytoskeletts und zum Aufbau der meiotischen Spindel (Miller *et al.*, 2001; Greenstein, 2005).

Der diploide Chromosomensatz wird zum haploiden Satz der Gameten reduziert (Miller *et al.*, 2001; Hajnal & Berset, 2002). Dabei verlieren die Eizellen ihre maternalen Centriolen und die Meiose findet ohne sie statt (Albertson & Thomson 1993). Sukzessive werden zwei Polkörper vom Oocytenkern abgeschnürt, die kurz nacheinander in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle am späteren anterioren Pol aus dem Cytoplasma ausgestoßen werden. Bei der Meiose I, aus der der erste Polkörper hervorgeht, wird der DNA-Gehalt des Kernes von 4c auf 2c halbiert. Der erste Polkörper weist ebenfalls einen DNA-Gehalt von 2c auf.

Bei der anschließenden Meiose II wird nochmals 1c in Form des zweiten Polkörpers vom Kern abgeschnürt, so dass der Oocytenkern nun haploid und die Gametenbildung abgeschlossen ist (Nigon *et al.*, 1960). Das Spermium bringt das für die Furchungsspindel notwendige Centriol mit.

Bei *C. elegans* wird durch den Eintritt des Spermiums die Polarität des Embryos induziert und mit der Ausbildung der anterior-posterior Achse die erste von drei embryonalen Achsen festgelegt (Goldstein & Hird, 1996). Das Spermium induziert die Bildung eines MTOC (microtubule-organizing center) in der Zygote. Da das mütterliche Centriol in *C. elegans* während der Bildung der Gameten abgebaut wurde, ist die Zygote unbedingt auf das Centriol des Spermiums angewiesen, um einen vollständigen Spindelapparat aufbauen zu können. Dabei können auch entkernte Spermien eine Polarität induzieren (Sadler & Shakes, 2000).

Das Centriol verdoppelt sich kurz nach der Befruchtung, behält aber noch Kontakt zum männlichen Vorkern.

Nach Bildung von zwei Centrosomen, jeweils durch Duplikation des Centriols und Umhüllung mit maternalem pericentriolarem Material (Delattre & Gönczy, 2004), weichen die Centrosomen auseinander und stellen die Ansatzpunkte für die erste Teilungsspindel dar (Albertson, 1984). Entlang sich ausbildender Mikrotubulistränge finden Umverteilungen von zunächst homogen im Cytoplasma vorliegenden maternal codierten Proteinen hauptsächlich der PAR-Gruppe teils zum anterioren teils zum posterioren Pol statt. Es entsteht ein Cytoplasmastrom, der in Richtung der Spermiumaster entlang der Längsachse des Embryos

verläuft und zentrales Cytoplasma zum späteren posterioren Pol und kortikales Material in entgegengesetzte Richtung transportiert. Die dadurch entstehenden Asymmetrien entlang der anterior-posterior Achse werden durch die folgende Zellteilung fixiert (Wallenfang & Seydoux, 2000).

Bei *C. elegans* wird der Eipol der Oocyte, der zuerst in die Spermatheka gelangt und damit nach Passage der Vulva am nächsten liegt, durch das eindringende Spermium befruchtet und markiert in 98% der Fälle den späteren posterioren Pol des Embryos (Albertson, 1984; Cowan & Hyman, 2004). In den wenigen Fällen, in denen bei *C. elegans* die AB-Zelle zur Vulva zeigt (2%), sind unreife Oocyten in die Spermatheka gelangt und dann nach Erreichen der Befruchtungsreife von anderen Seiten als dem posterioren Pol befruchtet worden. Dieser Zusammenhang konnte auch experimentell von Goldstein & Hird (1996) nachgewiesen werden. Die Ausbildung der dorso-ventralen Achse bei *C. elegans* erfolgt wie bei Cephalobiden und Plectiden und wird in Kapitel 7.5.2.1 dargestellt.

Abbildung 5.6 zeigt einige frühe Stadien der Embryonalentwicklung von *C. elegans*.

Ungefähr 30 min nach Abschluss der Meiose entstehen männlicher und weiblicher Vorkern an den gegenüberliegenden Polen des Eies. Die Vorkerne wandern aufeinander zu, treffen sich etwas posterior des Zentrums, verschmelzen und bilden die diploide Zygote (Abbildung 5.6 a-d).

Im Uterus wird das Ei von einer transparenten Eischale umgeben und beginnt dann mit den ersten Teilungen noch im Muttertier. Etwa im 50-Zellstadium werden die Eier abgelegt.

Obwohl die Furchung also schon im Elterntier beginnt, können die Eier durch Aufschneiden des Muttertieres direkt nach der Befruchtung in Medium entlassen werden, so dass die gesamte Embryogenese unter dem Mikroskop beobachtet werden kann.

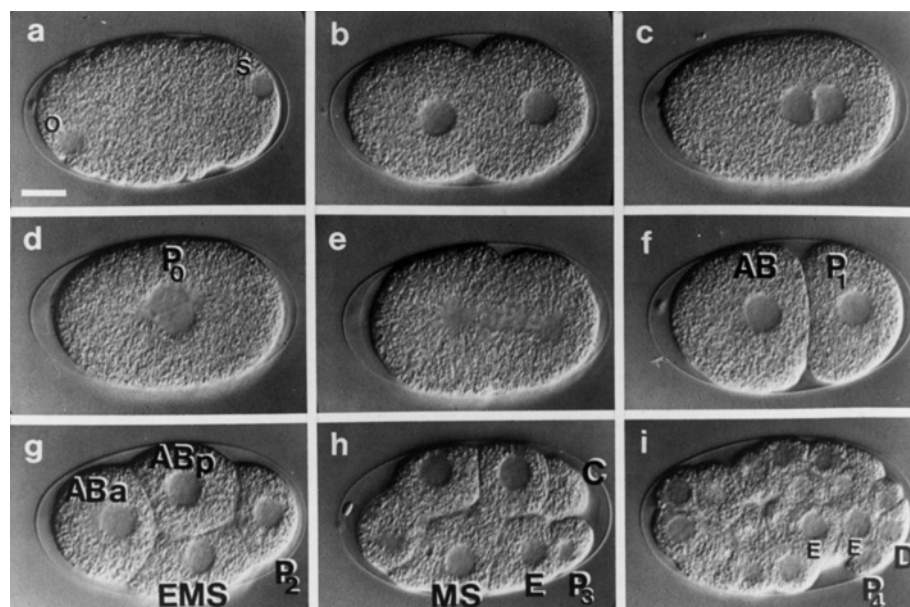


Abbildung 5.6: Frühe Embryonalstadien von *C. elegans*, entnommen aus Schierenberg & Cassada, 1986: (a) Bildung des weiblichen (o) und männlichen (s) Vorkernes, (b) Wanderung der Vorkerne mit Pseudofurchung, (c)

Zusammentreffen beider Vorkerne, (d) Verschmelzung zur Zygote P_0 , (e) erste Zellteilung, (f) 2-Zellstadium, (g) 4-Zellstadium, (h) 12-Zellstadium, (i) ca. 26-Zellstadium mit Einwanderung der beiden Darmvorläuferzellen E.
Nomarskioptik, Eichstrich: 10 μm

Das Ei beginnt sich zu furchen, indem sich im Rahmen einer frühen Keimbahn-Soma-Trennung das 1-Zellstadium (P_0) in die anterior gelegene somatische AB-Zelle und die posterior gelegene neue Keimbahnzelle P_1 teilt (Abbildung 5.6 f). Infolge von inäqualen Teilungen der jeweiligen Keimbahnzelle P_1 bis P_3 entstehen nach und nach bis zum 24-Zellstadium die fünf somatischen Gründerzellen AB, E, MS, C, D und die Keimbahnzelle P_4 (Abbildung 5.6 f-i). Eine Ausnahme ist die EMS-Zelle, die sich mit der nächsten Teilung nochmals in die zwei somatischen Gründerzellen MS und E aufspaltet (Abbildung 5.6 g+h). Aus der E-Zelle geht ausschließlich Darm hervor, wohingegen MS hauptsächlich zu Pharynx und Körpermuskulatur beiträgt (Deppe *et al.*, 1978; Schierenberg, 1997 a; Schierenberg & Cassada, 1986; Sulston *et al.*, 1983; von Ehrenstein & Schierenberg, 1980).

Zunächst entstehen die Keimbahnzellen jeweils posterior ihrer somatischen Schwester. Bei den Teilungen der Keimbahnzelle P_2 und P_3 wird die neue Keimbahnzelle P_3 bzw. P_4 anterior ihrer somatischen Schwester C bzw. D geboren. Dieser als Polaritätsumkehr bezeichnete Prozess (Abbildung 5.7) bringt die Keimbahn in Kontakt zu EMS bzw. E (Schierenberg, 1987 b; Schierenberg *et al.* 1997/98).

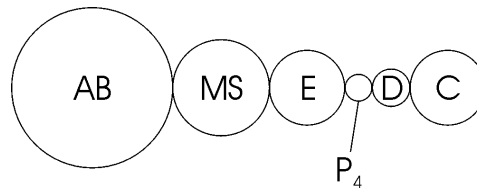


Abbildung 5.7: Polaritätsumkehr bei *C. elegans*, entnommen aus Schierenberg *et al.*, 1997/98

Jede der fünf Ursomazellen ist Mutterzelle einer Zelllinie, die sich aus einer festen Anzahl von Nachkommen mit invariablen Schicksal zusammensetzt. Die Mitglieder einer Zelllinie teilen sich synchron mit einem Zellteilungsrythmus, der für jede Zelllinie eigen ist. Dabei ist der Rhythmus der AB-Zellen am kürzesten während sich die Zellen der Keimbahn bzw. die D-Zellen als Gründerzellen am langsamsten teilen.

Aufgrund des invariablen Zellteilungsmusters und der Zellkonstanz lässt sich die Entwicklung mit Hilfe von Zellstammbäumen erfassen (Abbildung 5.8). Sie beschreiben das Teilungsverhalten jeder Zelle und somit auch ihre Herkunft und ihr Schicksal.

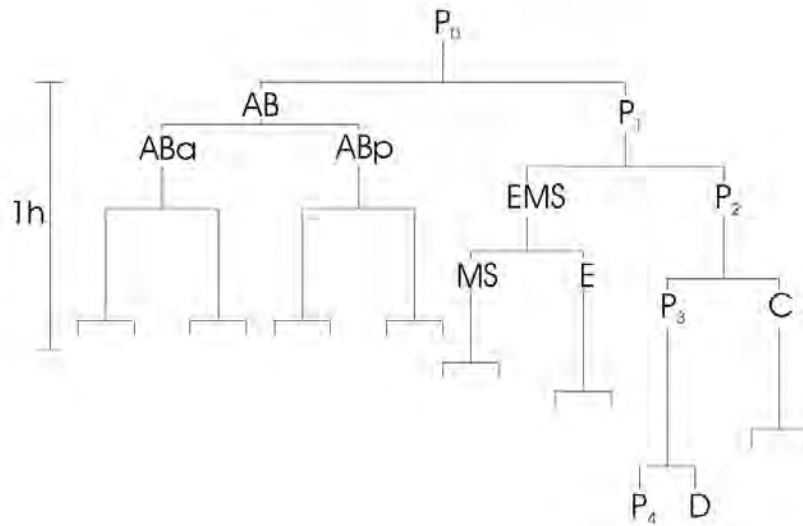


Abbildung 5.8: Zellstammbaum von *C. elegans*, entnommen aus Wiegner, 1998.

Die Benennung einer Blastomere setzt sich aus der Bezeichnung der Mutterzelle und der Position der Nachkommenzelle relativ zu ihrer Schwesterzelle zusammen. So heißen die Tochterzellen der AB-Zelle ABa (anterior) und ABp (posterior). Bei den weiteren Teilungen werden nach demselben Prinzip entsprechende Abkürzungen als Positionsmarker an den Namen der jeweiligen neuen Mutterzelle angehängt. Dabei stehen a, p, l, r, v und d als Abkürzungen für anterior, posterior, links, rechts, ventral und dorsal. Bei jeder Aufzweigung werden anteriore, dorsale und linke Zellen nach links und posteriore, ventrale und rechte Schwesterzellen nach rechts gezeichnet.

Vereinfacht kann die Abfolge der Zellteilungen auch als Tabelle dargestellt werden (Tabelle 1).

<i>Caenorhabditis elegans</i>	
Zelle in Teilung	Zellstadium
P ₀	2
¹ AB ²	3
P ₁	4
² AB ⁴	6
EMS	7
P ₂	8
⁴ AB ⁸	12
¹ MS ²	13
¹ E ²	14
¹ C ²	15
P ₃	16
⁸ AB ¹⁶	24
² MS ⁴	26
² C ⁴	28
¹⁶ AB ³²	44
² E ⁴	46
¹ D ²	47
⁴ MS ⁸	51

Tabelle 1: Zellteilungssequenzen von *C. elegans*, entnommen aus Schierenberg, 1978. Das grau-unterlegte Feld markiert den Zeitpunkt der E-Zelleinwanderung (Beginn der Gastrulation).

Die Hochzahlen vor der Zelllinie geben dabei an, wie viele Angehörige vor der Teilung existieren. Die nachgestellten Hochzahlen geben die Anzahl der Angehörigen nach erfolgter Teilung an. Die mit dem Wort Zellstadium überschriebene Spalte gibt die jeweilige Gesamtzahl der Zellen des Embryos nach der Teilung an. (zum Beispiel ¹AB² > Die AB-Linie ist mit einer Zelle vertreten. Nach der Teilung existieren zwei AB-Zellen. Insgesamt befindet sich der Embryo zu dem Zeitpunkt im 3-Zellstadium).

Nach jahrelanger Arbeit ist inzwischen die gesamte Embryogenese vom Ei über das geschlüpfte Tier und die postembryonale Entwicklung bis zum Adulten auf zellulärer Ebene bekannt. *C. elegans* dient inzwischen als Basis für die Analyse der Entwicklung bei Defektmutanten und als Ausgangspunkt für den Vergleich mit anderen Spezies.

Die Gastrulation, in deren Zug unter anderen die Darmvorläuferzellen ins Zentrum verlagert werden, beginnt ungefähr 2-3 h nach der Befruchtung und 100 min nach der ersten Teilung.

Bei *C. elegans* und der überwiegenden Zahl der untersuchten Nematoden geht die Darmvorläuferzelle E aus der asymmetrischen Teilung der EMS hervor (Abbildung 5.6 g+h) (Priess & Thomson, 1987). Die E-Zelle teilt sich in die Töchter Ea und Ep, die an der Ventralseite des Embryos liegen. Im 26-Zellstadium beginnt die Gastrulation mit der Einwanderung der beiden Darmvorläuferzellen (Sulston *et al.*, 1983; Schierenberg, 1987 a; Junkersdorf & Schierenberg, 1992; Skiba & Schierenberg, 1992; Nance & Priess, 2002). Dabei nehmen die beiden E-Zellen eine leicht spindelförmige Gestalt an und schieben sich

zwischen die anderen Zellen ins Zentrum vor (Abbildung 5.6 i, Abbildung 7.32 a,b). Eine ausgeprägtes Blastocoel ist nicht vorhanden. Stattdessen existieren einige wenige extrazelluläre Spalten, die jedoch nur 2% des Gesamtvolumens des Embryos ausmachen. Für die Spaltenbildung sind PAR-Proteine nötig (Nance & Priess, 2002; Nance *et al.*, 2003). Apikale Myosinaktivität erfolgt, um Zellen während der Gastrulation richtig zu positionieren und die entstandene Lücke zu schließen (Lee & Goldstein, 2003; Nance *et al.*, 2003).

Nachdem die E-Zellen ihre endgültige Position im Zentrum des Embryos erreicht haben, teilen sie sich im 44-Zellstadium in vier Zellen und begründen so rechte und linke Anteile des Darmes (Abbildung 5.9 a). Durch fortlaufende Teilungen bilden sie schließlich als einzige Zelllinie den gesamten Darm.

Die Etablierung der bilateralen Symmetrie in den einzelnen Zelllinien von *C. elegans* wurde von verschiedenen Autoren darunter Schierenberg (1978), von Ehrenstein & Schierenberg (1980), Sulston *et al.* (1983), Schierenberg *et al.* (1984) genau untersucht. Da *C. elegans* in dieser Arbeit als Vergleichsgrundlage dient, wurden wie in Kapitel 6.11 beschrieben 3D-Computerrekonstruktionen des Embryos in verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung angefertigt und die bekannten Ergebnisse in Kapitel 7.8.1 daran nachvollzogen.

Im Anschluß an die Teilung von P₄ im 100-Zellstadium wandern auch die beiden Nachkommen Z2 und Z3, die den generativen Teil der Gonade ausmachen, ins Eiinnere, gefolgt posterior von den D-Zellen, etwas später von einem Teil der C-Zellen und im anterioren Bereich von den MS-Zellen. Mit der Einwanderung der Mesodermvorläuferzellen ist die Gastrulation abgeschlossen. Gleichzeitig gelangen AB-Zellen von links und rechts auf die Bauchseite. Schließlich bleibt nur noch eine Rinne an der ventralen Mittellinie, die dann auch von AB-Zellen verschlossen wird. Bald darauf beginnt die Morphogenese (Schierenberg, 1987 a).

Die Bezeichnung der aufeinander folgenden Morphogenesestadien erfolgt anhand ihres Aussehens (Abbildung 5.9 d-h).

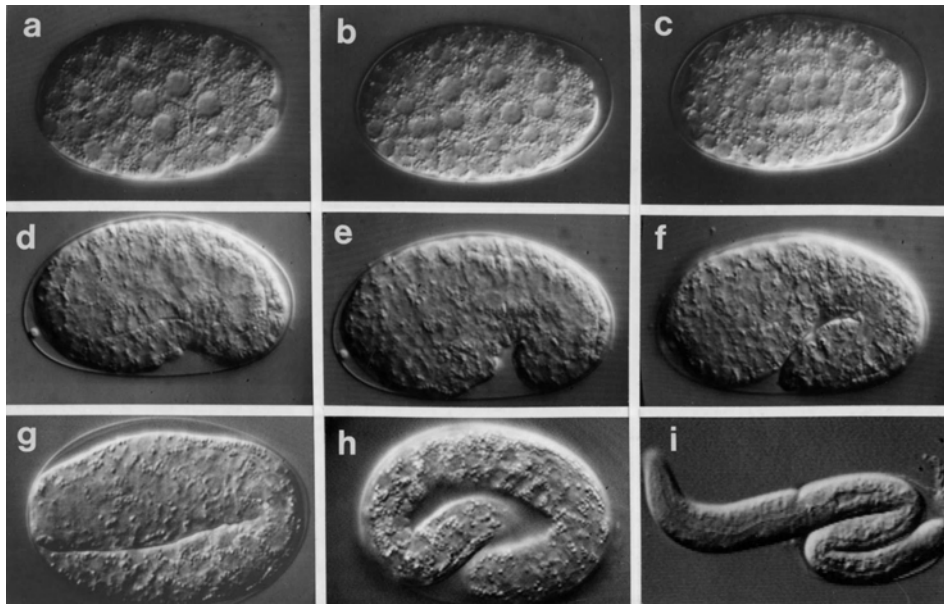


Abbildung 5.9: Darmanlage und Morphogenesestadien von *C. elegans*, entnommen aus Schierenberg *et al.*, 1987, gekürzt. (a) Embryo mit 4 E-Zellen, (b) mit 8 E-Zellen, (c) mit 16 E-Zellen, (d) Bohnen, (e) Komma, (f) Kaulquappe, (g) Pflaume, (h) Brezel, (i) Schlupf. Nomarski-Optik

Dabei entsteht zunächst eine ventrale Einbuchtung (Bohnenstadium, Abbildung 5.9 d). Mit Erreichen des 400-Zellstadiums streckt sich der Embryo und beginnt sich zu bewegen. Der anteriore Bereich erscheint im Kommastadium (Abbildung 5.9 e) und im anschließenden Kaulquappenstadium (Abbildung 5.9 f) gegenüber dem posterioren Bereich noch stark vergrößert bzw. aufgetrieben. Unter zunehmender Verlängerung und Verschmälerung wird das Tier nach und nach immer wurmähnlicher. Im Pflaumenstadium (Abbildung 5.9 g), in dem das Tier ausgestreckt zweimal so lang wie das Ei ist, sind anteriorer und posteriorer Bereich gleich dick. Es folgen Brezel- (Abbildung 5.9 h) und Schlingenstadium. Anschließend windet sich das Tier noch ungefähr weitere 4 h im Ei, bevor es schlüpft (Abbildung 5.9 i).

Lange galt *Caenorhabditis elegans* als klassischer Mosaikentwickler. Die Vorstellung, dass cytoplasmatische Determinanten bei einer asymmetrischen Zellteilung ungleich auf die Tochterzellen verteilt werden und so zwei unterschiedlich programmierte Zellen entstehen, sah man durch die frühe Keimbahn-Soma-Trennung und die Abspaltung der Gründerzellen von der Keimbahn bestätigt.

Der Nachweis von keimbahnspezifischen Granula (P-Granula) mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern bestärkte diese Theorie.

P-Granula sind bereits in der Zygote vorhanden und werden als cytoplasmatische Komponente vor der Teilung jeder Keimbahnzelle so umverteilt, dass sie nur an die neue Keimbahnzelle weitergegeben werden (Goldstein & Hird, 1996; Hyman & White, 1987; Strome & Wood 1983; Wallenfang & Seydoux, 2000). Es handelt sich dabei um Aggregate aus *vasa*mRNA und Proteinen. Funktion ist der Erhalt der Totipotenz der Keimbahn (Strome *et al.*, 1994; Seydoux & Schedl, 2001).

Zusammen mit der Zellkonstanz und dem invariablen Zellteilungsmuster galt die Existenz und Verteilung der P-Granula als weiteres Argument für eine zellautonome Entwicklung ohne Einflußnahme durch Nachbarzellen.

Es wurde angenommen, dass nach diesem Schema eine Vielzahl von weiteren entwicklungsrelevanten Faktoren einem Mosaik gleich verteilt werden und so das Schicksal der Zellen festgelegt und unabhängig und unbeeinflussbar von anderen Zellen wird. Unterstützt wurde diese Vorstellung durch Untersuchungen, in denen isolierte Blastomeren das gleiche Teilungs- und Differenzierungsmuster zeigten wie im intakten Embryo (Laufer *et al.*, 1980). Ebenso ergaben Ablationsexperimente (Sulston *et al.*, 1983; Junkersdorf & Schierenberg, 1992), bei denen einzelne Zellen durch Laserstrahl abgetötet wurden, dass sich das Zellteilungsmuster der übrigen Zellen unverändert fortsetzte.

Inzwischen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass das Schicksal von Zellen nicht allein durch ihre Genealogie bestimmt wird, sondern dass zahlreiche, allerdings sehr früh stattfindende Zell-Zell-Interaktionen das Entwicklungsschicksal der frühen Blastomeren spezifizieren (Schierenberg, 1997 b; Schnabel & Priess, 1997). Durch fünf kontaktvermittelte Interaktionen auf der Ebene einzelner Blastomeren erfolgt die Spezifikation der frühen AB-Zellen (Hutter & Schnabel 1995 a,b; Priess & Thomson, 1987; Schierenberg, 1997 b).

Fünf weitere Induktionen sind für die Spezifikation der mesodermalen und endodermalen Zellschicksale in den Nachkommen der P₁-Zelle notwendig. Vier Induktionsvorgänge betreffen dabei die Differenzierung von Körpermuskulatur innerhalb der MS-, C-, und D-Zellen (Goldstein, 1992 & 1993; Schnabel, 1994 & 1995).

Das Bild, das in den letzten Jahren von *C. elegans* entworfen werden konnte, entspricht also nicht mehr dem des klassischen Mosaikentwicklers, sondern weist auch deutliche Elemente der regulativen Entwicklung auf. Zeitlich wie räumlich koordinierte Zell-Zell-Interaktionen stellen sicher, dass das zelleigene Differenzierungspotential modifiziert wird und somit das Schicksal der Blastomeren durch eine Kombination von zellautonomen Prozessen und kontaktvermittelten Induktionen festgelegt wird.

Schierenberg, 1997 b, fasste folgende Schlussfolgerungen zusammen:

1. Zellen besitzen intrinsische Entwicklungsprogramme.
2. Diese Programme stehen in der Regel für bestimmte, oft komplexe Zellteilungs- und Differenzierungsmuster, nicht für eine frühe Aufspaltung in verschiedene Gewebetypen.
3. Durch Interaktion einer Zelle mit einer anderen kann ihr intrinsisches Programm moduliert oder vollständig verändert werden.
4. Für Interaktionen sind Zellkontakte notwendig.
5. Interaktionen können latente Entwicklungsoptionen aktivieren oder normalerweise aktivierte blockieren.
6. Interaktionen zwischen 2 Zellen können auch reziprok verlaufen.
7. Interaktionen erfolgen sequentiell und wirken hierarchisch.

8. Die schrittweise Festlegung auf ein bestimmtes Entwicklungsprogramm lässt sich beschreiben als Code von binären Entscheidungen, zunächst in Form von inäqualen Zellteilungen und dann in Form von Zell-Zell-Interaktionen.
9. Für die korrekte Präsenz entwicklungsrelevanter Genprodukte sorgen zum einen ungleiche Verteilung cytoplasmatischer Komponenten, zum anderen differentielle Transkription und Translation.
10. Die im Gegensatz zu den Somazellen unterdrückte Transkription entwicklungsrelevanter Gene in der Keimbahn ist Ausdruck und vermutlich Notwendigkeit für den Erhalt der Pluripotenz.

5.2 Die untersuchten Nematodenspezies in der Literatur

Die meisten der in dieser Arbeit verwendeten Nematodenspezies wurden bislang nur morphologisch untersucht. Embryologische Aspekte finden in der Literatur oft nur rudimentär Erwähnung. Bei vielen Spezies existieren gar keine Informationen zur Embryologie. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der vergleichenden Embryologie von Nematoden beruht, wird die Morphologie bewusst nicht erschöpfend dargestellt, sondern dient nur als Übersicht der untersuchten Spezies.

5.2.1 *Diploscapter coronatus*

Wie *C. elegans* ist auch *D. coronatus* ein Vertreter der Klasse der Secernentea, Ordnung Rhabditida, Superfamilie Rhabditioidea, Familie Rhabditidae. Er ist der nächste Verwandte von *C. elegans*, der in dieser Arbeit untersucht wird (Blaxter *et al.*, 1998, Abbildung 4.1, Abbildung 4.2).

5.2.1.1 Morphologie und Biologie von *D. coronatus*

Der adulte *D. coronatus* ist kleiner und wirkt plumper als *C. elegans* (Zell, 1993, Abbildung 5.10 b). Sein Kopf trägt einen Kranz aus vier Borsten, von denen meist nur zwei in einer Ebene zu sehen sind. *D. coronatus* besitzt ein relativ langes, starres Mundrohr, das in einen breiteren Pharynx mündet. Nach einem Isthmus schließt sich ein Bulbus mit Klappen an (Abbildung 5.10 a, Abbildung 7.1). Der zweiarmige Gonadenschlauch knickt wie bei *C. elegans* nach anterior bzw. posterior um. Der Anteil hinter der Umschlagstelle fällt jedoch kürzer aus (Abbildung 5.10 b, Abbildung 7.1). Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Spezies finden sich bei Eyualem *et al.* (1998).

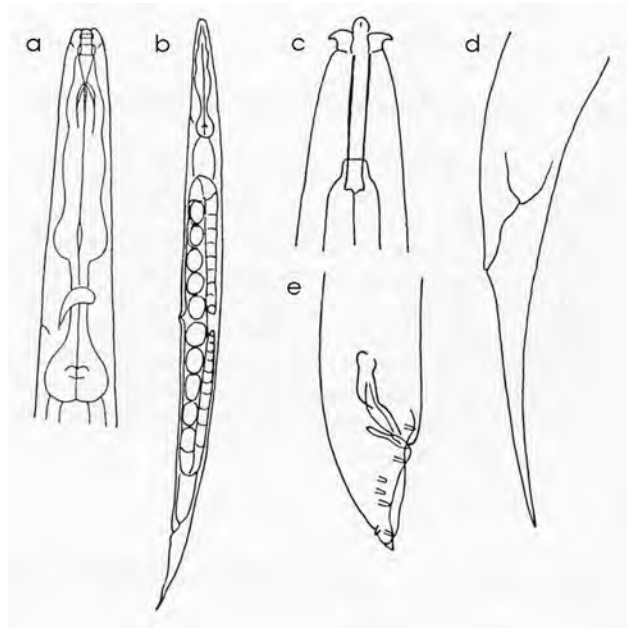


Abbildung 5.10: Schematische Darstellung von *D. coronatus*, entnommen aus Zell, 1993. (a) Pharynxbereich, (b) Habitus, Pharynx, Gonadenschlauch, (c) Lippen und Mundrohr, (e) Schwanzspitze mit Borsten, (d) Schwanzbereich mit Anus.

5.2.1.2 Embryologie von *D. coronatus*

Zur Embryologie von *D. coronatus* lassen sich keine Informationen finden, so dass anzunehmen ist, dass *D. coronatus* bisher nicht embryologisch untersucht wurde. Tahseen *et al.* (1991) haben die Anordnung der Blastomeren bis zum 4-Zellstadium bei *D. orientalis* untersucht. Hier zeigt sich eine lineare Anordnung wie bei *D. coronatus*.

5.2.2 Acrobeloiden

Acrobeloiden gehören wie *C. elegans* und *D. coronatus* zu der Klasse der Secernentea, Ordnung Rhabditida. Ihre weitere Einteilung erfolgt in die Superfamilie Cephaloboidea, Familie Cephalobidae. Eine phylogenetische Einordnung ist in Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2 dargestellt.

5.2.2.1 Morphologie und Biologie der Acrobeloiden

Vertreter der Familie Cephalobidae haben einen Pharynx mit Bulbus und Gegenklappenapparat. Der Schwanz ist auffallend kurz und endet stumpf (Abbildung 5.11). Der zweiarmige Gonadenschlauch schlägt jeweils proximal und distal um. Die Oocyten sind bis zum Zeitpunkt der Aktivierung bzw. Befruchtung in der meiotischen Prophase arretiert (zum Bsp. Wiegner, 1998).

Acrobeloides nanus

A. nanus hat eine Körperlänge von ca. 500 µm und ist somit deutlich kleiner als *C. elegans* (Abbildung 5.11). Er pflanzt sich auf parthenogenetische Weise fort (Kutzowitz, 1993; Bird *et*

al., 1994; Wiegner, 1998; Sadler, 2000; Lahl *et al.*, 2006) und trägt in seinem Uterus immer nur ein aktiviertes Ei, das normalerweise im 1-Zellstadium abgelegt wird. Spermatheka oder Spermien konnten nicht nachgewiesen werden.



Abbildung 5.11: Adulter *A. nanus*, entnommen aus Skiba, 1990, modifiziert. * kastenförmige Oocyten. Nomarskioptik, Eichstrich: 10µm

Bei *A. nanus* wird während der Meiose in 94% der Fälle nur ein Polkörper ausgestoßen (Kutzowitz, 1993). Bei den restlichen Embryonen treten zwei Polkörper auf, die jedoch wahrscheinlich aus der Teilung des ersten Polkörpers hervorgehen. Sadler (2000) beobachtete vor der ersten Teilung des Embryos eine zusätzliche Kernteilung ohne Zellteilung. Anschließend verschmolzen die beiden Kerne wieder zu einem Zellkern. Er wertete diesen Vorgang als meiotische Teilung, die durch die Verschmelzung wieder rückgängig gemacht wird. Auf diese Weise kann eine Diploidie des Eies erreicht werden.

„Herma-1“ (PS 1146)

„Herma-1“ ist ein hermaphroditischer Acrobeloide. Die Art stimmt in den wesentlichen anatomischen Merkmalen mit *A. nanus* überein. Die adulten Tiere sind mit einer Länge von ca 1000 µm allerdings ungefähr doppelt so groß und erscheinen schlanker (Sadler, 2000).

Die zeitlich vor den Oocyten produzierten Spermien werden in einer Spermatheka gespeichert. „Herma-1“ trägt immer nur ein befruchtetes Ei im Uterus, das im 1-Zellstadium gelegt wird.

Es konnten drei Polkörper nachgewiesen werden (Sadler, 2000; Lahl *et al.*, 2006). Während der Meiose werden zunächst nacheinander zwei Polkörper vom Kern abgeschnürt. Im 2- bis 3-Zellstadium findet dann eine Teilung des ersten Polkörpers statt. Ab dem 5-Zellstadium konnten dann bei allen Embryonen drei Polkörper nachgewiesen werden. Die Meiose von „Herma-1“ folgt also zumindest, was die Anzahl der Polkörper betrifft, dem klassischen Schema (Sadler, 2000; Lahl *et al.*, 2006).

5.2.2.2 Embryologie der Acrobeloiden

Acrobeloides nanus

Das Zellteilungsmuster ist bei *A. nanus* invariant, weicht aber deutlich von dem von *C. elegans* ab. Asymmetrische Zellteilungen führen zwar auch hier zur schrittweisen Trennung

von Soma und Keimbahn und es entstehen die gleichen somatischen Gründerzellen AB, MS, E, C, D und die Keimbahnzelle P_4 (Abbildung 5.12, Abbildung 5.14).

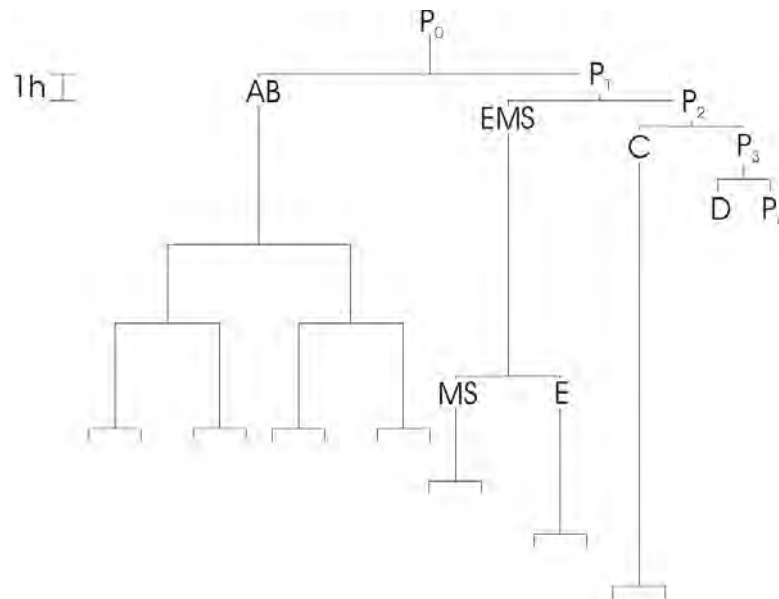


Abbildung 5.12: Zellstammbaum von *A. nanus*, entnommen aus Wiegner, 1998.

Anders als bei *C. elegans* teilt sich die Keimbahn jedoch sehr früh bis auf eine eingeschobene Teilung der AB-Linie vollständig bis zur Entstehung von P_4 . Damit entsteht die Urkeimzelle bei *A. nanus* bereits im 6-Zellstadium, während dies bei *C. elegans* erst mit der Teilung zum 24-Zellstadium geschieht (Schierenberg *et al.*, 1997/98; Wiegner, 1998).

Auch die räumliche Anordnung vor allem der Zellen EMS, C, P_3 bzw. EMS, C, D, P_4 weist einige Abweichungen zum von *C. elegans* bekannten Muster auf (Kutzowitz, 1993; Schierenberg *et al.*, 1997/98). Innerhalb dieser Zellgruppe kommen vier Positionsvarianten in der Anordnung zueinander vor. Ein Kontakt der EMS zur Keimbahn wie bei *C. elegans* kann vorkommen, muss aber nicht. Die Mustervarianten münden jedoch durch kompensatorische Wanderung der P_4 -Zelle alle zu Beginn der Gastrulation in ein Muster, in dem ein Kontakt zwischen P_4 und EMS etabliert ist (Skiba & Schierenberg, 1992).

Eine Polaritätsumkehr, wie bei *C. elegans*, während der bei den letzten beiden Teilungen der Keimbahnzelle die jeweils neu gebildete Keimbahnzelle (P_3 bzw. P_4) anterior zu ihrer somatischen Schwester (C bzw. D) zu liegen kommt (Abbildung 5.7), fehlt bei *A. nanus*. Alle Teilungen der Keimbahn sind bei *A. nanus* so polarisiert, dass die neue Keimbahnzelle posterior zu ihrer somatischen Schwester gebildet wird (Abbildung 5.13). Die oben beschriebene kompensatorische Wanderung von P_4 ist somit nötig, um einen Kontakt zu EMS herzustellen.

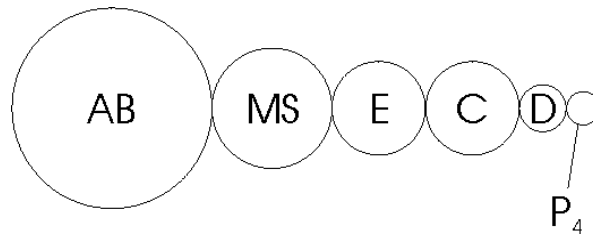


Abbildung 5.13: Polaritätsumkehr bei *A. nanus*, entnommen aus Schierenberg *et al.*, 1997/98
Im Zuge der Gastrulation werden wie bei *C. elegans* zwei Darmvorläuferzellen ins Zentrum des Embryos verlagert (Wiegner, 1998; Abbildung 5.14 D, E).

Die gesamte Embryogenese von *A. nanus* vom Legen des Eies bis zum Schlupf der L₁ dauert bei Zimmertemperatur ($21^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$) 50 bis 60 h. Die Entwicklungsdauer ist damit um das 4- bis 5-fache länger als bei Embryonen von *C. elegans*, die unter gleichen Bedingungen nach etwa 12 h schlüpfen (Wiegner, 1998). Während der Morphogenese werden die üblichen Morphogenesestadien, die auch dieselben Bezeichnungen wie bei *C. elegans* tragen, durchlaufen (Abbildung 5.14 H, I).

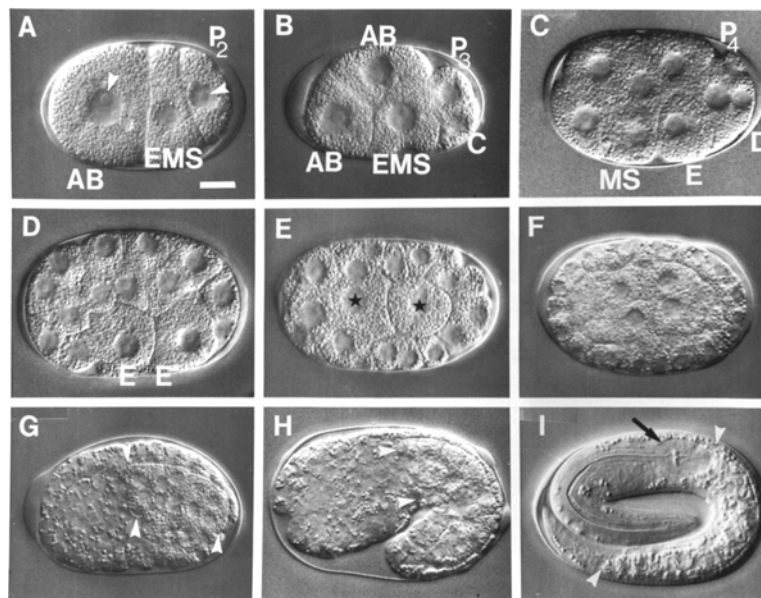


Abbildung 5.14: Ausgesuchte Stadien der Embryogenese von *A. nanus*, entnommen aus Wiegner, 1998. (A) 3-Zellstadium, Pfeilspitzen deuten auf Nucleoli, (B) 5-Zellstadium, EMS mit ventraler Einbuchtung, (C) 9-Zellstadium, (D) 26-Zellstadium, Beginn der Einwanderung der beiden E-Zellen, (E) 2E-Zellstadium, beide E-Zellen mit * markiert, (F) 4E-Zellstadium, (G) Darmprimordium (Pfeilspitzen) mit 16 E-Zellen, (H) Kaulquappenstadium mit granulareichem Darmprimordium (Pfeilspitzen), (I) Larve kurz vor dem Schlupf, schwarzer Pfeil: terminaler Pharynxbulbus, weiße Pfeilspitzen: Anfang und Ende des Darmes. Orientierung anterior=links, Nomarskiophtik. Eichstrich: 10µm

Wiegner & Schierenberg haben 1999 an *A. nanus* gezeigt, dass eliminierte Blastomeren in einer hierarchischen Art und Weise durch benachbarte Zellen ersetzt werden können.

Zum Beispiel wird dort eine abgetötete EMS-Zelle durch die C-Zelle, die dramatischen Änderungen des Furchungs- und Differenzierungsmusters unterworfen wird, ersetzt. Die C-Zelle teilt sich nicht wie üblich in eine linke und eine rechte Zelle, sondern weist eine deutlichere anterior-posteriore Teilungsrichtung wie bei der Teilung der EMS-Zelle in MS und E auf. In der weiteren Entwicklung verhalten sich die Töchter von C wie zwei verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichen Zellteilungsrythmen.

Um den bei unbehandelten Embryonen üblichen Zeitpunkt der Gastrulation wandern die beiden posterioren Enkel von C ein und bilden die Darmanlage, die unter normalen Umständen ausschließlich von E-Nachkommen gebildet wird.

Bei EMS-ablatierten Embryonen von *A. nanus*, bei denen eine Zellschicksalstransformation der C-Zelle stattgefunden hat, wird wie bei unbehandelten Embryonen von *A. nanus* und *C. elegans* ein fluoreszierender Marker von den sich differenzierenden Darmzellen endozytiert und akkumuliert, während die Fluoreszenz in den umliegenden Zellen verschwindet (Bossinger & Schierenberg 1992, 1996 a).

Embryonen von *C. elegans* sind zu dieser Form von Regulation nicht fähig.

„Herma-1“ (PS 1146)

Der Ablauf der Zellteilungen von „Herma-1“ ist wie bei *A. nanus* invariant und es werden die gleichen Gründerzellen gebildet. Bis zur Teilung von P_3 in P_4 und D stimmt die Reihenfolge der Zellteilungen mit der von *A. nanus* überein. „Herma-1“ entwickelt sich jedoch deutlich langsamer als *A. nanus*. 6 h nach der ersten Teilung entsteht erst die Keimbahnzelle P_3 , wohingegen *A. nanus* für diesen Vorgang nur 2 h benötigt (Kutzowitz, 1993).

Eine Besonderheit bei „Herma-1“ ist die erneute Teilung der P_4 -Zelle in einem sehr frühen Stadium. Ob es sich bei dieser Teilung um eine gleichwertige oder eine ungleichwertige Teilung handelt, ob also die Nachkommen beide Keimbahncharakter haben oder eine Keimbahn- und eine Somazelle entstehen, blieb ungeklärt (Sadler, 2000).

5.2.3 Plectiden

Anders als die Rhabditiden und Cephalobiden gehören die Plectiden nach klassischer morphologischer Einteilung zu der Klasse der Adenophorea und abhängig vom Autor zu der Ordnung Aerolaimida bzw. Chromadorida. Adenophorea besitzen im Unterschied zu den Secernentea keine chemosensorischen Phasmiden.

Nach Blaxter *et al.* (1998) nehmen die Plectiden jedoch eine Zwischenstellung zwischen der adenophoreischen Clade II und der secernentischen Clade III ein (Abbildung 4.2).

5.2.3.1 Morphologie und Biologie der Plectiden

Zell hat 1993 ein umfassendes Werk zur Morphologie und Bestimmung von Plectiden veröffentlicht. Der darin dargestellte *Plectus sambesii* (Abbildung 5.15) ähnelt in vieler jedoch

nicht in jeder Hinsicht dem in dieser Arbeit untersuchten noch nicht klassifizierten „P. mekong“ (Paul De Ley, persönliche Mitteilung).

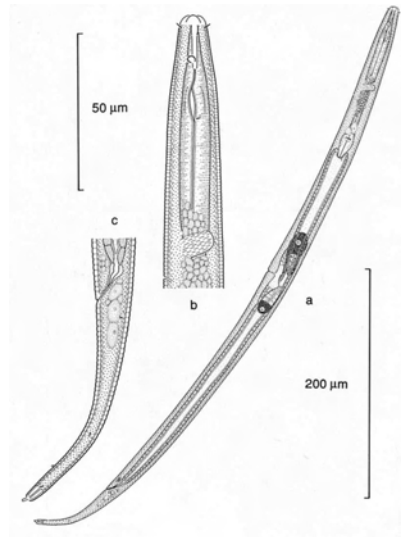


Abbildung 5.15: Schematische Darstellung von *Plectus sambesii* MICOLETZKY 1915, Weibchen, entnommen aus Zell, 1993. (a) Habitus, (b) Pharynxbereich, (c) Schwanz.

Ein weiterer bei Zell (1993) aufgeführte und in dieser Arbeit untersuchte Plectide ist *Plectus minimus* (Abbildung 5.16).

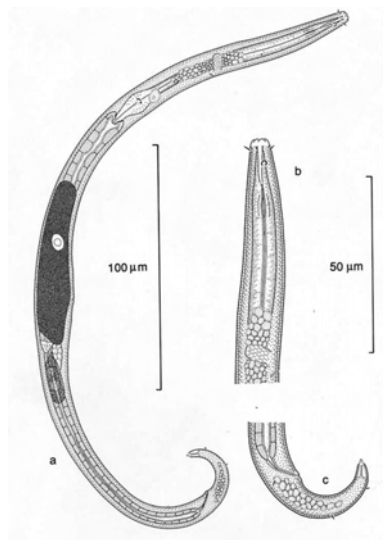


Abbildung 5.16: Schematische Darstellung von *Plectus minimus* COBB, 1893, Weibchen, entnommen aus Zell, 1993. (a) Habitus, (b) Pharynxbereich, (c) Schwanz.

Vertreter der Plectiden besitzen ebenfalls einen Pharynx mit Bulbus und Gegenklappenapparat. Wie Rhabditiden und Cephalobiden haben sie einen zweiarmigen Gonadenschlauch, der jeweils proximal und distal umschlägt (Abbildung 7.4).

Einige morphologische Charakteristika, die Plectiden von Rhabditiden und Cephalobiden unterscheiden, sind Form und Kutikularisierung der Mundhöhle, das Vorhandensein von Borsten (Setae) und eines schlaufenförmigen Chemorezeptors (Amphid, Abbildung 7.3 b,

Insert) in der Kopfregion. An der Schwanzspitze befindet sich eine Drüse, mit der sich der Wurm am Substrat anheften kann.

Die in dieser Arbeit untersuchten Plectiden haben zwar einige speziesspezifische Besonderheiten, vor allem was die Morphologie des Kopfes angeht (Abbildung 7.3), unterscheiden sich aber ansonsten weitgehend nur in der Größe.

Weitere zu der Familie der Plectidae gehörende und in dieser Arbeit untersuchte Genera sind *Anaplectus*, *Tylocephalus* und *Ereptonema*. Morphologische Beschreibungen finden sich zum Beispiel bei Andrassy (1984) Holovachov *et al.* (2003, 2004 a und b, 2006) und Zell (1993).

5.2.3.2 Embryologie der Plectiden

Zur Embryologie von Plectiden lässt sich nur wenig Literatur finden. Die Beobachtungen beschränken sich dabei jedoch auf bloße Beschreibung sehr früher Embryonalstadien (Maggenti, 1961; Drozdovskii, 1978; Tahseen *et al.*, 1992, Malakhov, 1994).

5.2.4 *Teratocephalus lirellus*

Die taxonomische Position von Teratocephaliden war in den letzten Jahren sehr umstritten (Boström, 1989). Sie wurden sowohl zu den Adenophorea (Lorenzen, 1981, 1983) bzw. basal der Secernentea (Maggenti, 1963), als auch als zwischen beiden stehend eingeordnet (Andrassy, 1958; Goodey, 1963). Die Nähe zu Plectiden wurde von De Coninck (1965), Eroshenko (1973), und Gerlach & Riemann (1973) angenommen.

Nach Blaxter *et al.* (1998) stellt *Teratocephalus lirellus* den nächsten Nachbarn zu den beiden aufgeführten *Plectus*-Spezies *P. aquatilis* und *P. acuminatus* dar (Abbildung 4.1).

De Ley & Blaxter (2002) bezeichnen das Genus *Teratocephalus* aufgrund seiner morphologischen Mittelstellung zwischen den Adenophorea und den Secernentea als "*only member of a family incertae sedis*". Weitere Untersuchungen führten zu einer Neupositionierung der Teratocephalidae innerhalb der Ordnung Rhabditida.

5.2.4.1 Morphologie und Biologie von *T. lirellus*

T. lirellus ist ca 550 µm lang. Er ist ein sehr schlanker Nematode mit einem spitz zulaufenden Schwanz. Phasmiden fehlen. Die Kutikula ist stark und tief geringelt und hat zusätzlich longitudinale Leisten (Abbildung 5.17). Der Pharynx ist rhabditid, der terminale Bulbus besitzt einen Klappenapparat. Der Gonadenschlauch ist einarmig und schlägt im Bereich des Ovars um (Andrassy, 1984; Khuong Nguyen, 2006).

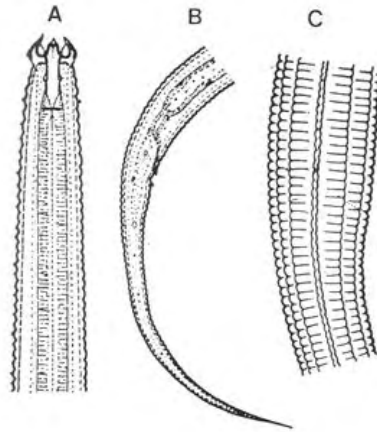


Abbildung 5.17: Schematische Darstellung von *Teratocephalus lirellus*. (A) anteriorer Bereich, (B) weiblicher Schwanz, (C) Struktur der Kutikula, entnommen aus Khuong Nguyen, 2006 (nach Andr  ssy).

Weitere Beschreibungen finden sich bei Anderson (1969), Karegar *et al.* (1997), Boström (1989) und Boström *et al.* (2000).

5.2.4.2 Embryologie von *T. lirellus*

Zur Embryologie von *T. lirellus* lassen sich keine Informationen finden, so dass anzunehmen ist, dass *T. lirellus* bisher nicht embryologisch untersucht wurde.

5.2.5 *Heterakis spumosa*

H. spumosa gehört zu den Clade III zuzurechnenden Ascaridida und ist wie *C. elegans* ein Mitglied der Secernentea (Abbildung 4.2). Die Superfamilie Heterakoidea setzt sich aus den beiden Familien Heterakidae und Ascaridiidae zusammen. Die Subfamilie Heterakinae beinhaltet das Genus *Heterakis*. Die nächste benachbarte Gruppe, die in dieser Arbeit untersucht wurde, sind die Plectidae.

5.2.5.1 Morphologie und Biologie von *H. spumosa*

Die Beschreibung der Morphologie findet sich in dem Ergebniskapitel 8.2.1.

H. spumosa ist ein direkter, monoxener (einwirtiger) Parasit des oberen Colons von Mäusen und Ratten. Die Eier werden im 1-Zellstadium abgelegt und gelangen über den Kot ins Freie, wo sie je nach Außentemperatur entweder mit ihrer Furchung beginnen oder zunächst als 1-Zellstadium verbleiben. Die Infektion des Wirtes erfolgt in der Regel durch Aufnahme von Eiern, die das infektiöse Stadium (L₃) enthalten. Die Larve kann dabei mehrere Monate im Ei verbleiben, ohne ihre Infektionsfähigkeit zu verlieren. Der Schlupf findet erst im Darm statt (Smith, 1953; Harder *et al.*, 1995). Nach dem Schlupf siedeln sich die L₃ auf den ersten Zentimetern des Colons an und entwickeln sich über die L₄ zu eiertragenden Adulten, ohne eine Körperwanderung durchzumachen.

Die Larven künstlich embryonierter Eier können durch bestimmte Komponenten in Kombination zum Schlupf angeregt werden. Die beste Schlupfrate ließ sich *in vitro* mit

Zugabe von Gallensalzen und Linolat erzielen. Der Schlupf ist auch mit einem Homogenisat aus abgeschabter, homogenisierter und zentrifugierter Darmmucosa induzierbar (Harder *et al.*, 1995).

5.2.5.2 Embryologie von *H. spumosa*

Die Angaben in der Literatur zur Entwicklung von *Heterakis spumosa* beschränken sich auf sehr ungenaue Formulierungen wie „Morula“ und „vermiform“ (Winfield, 1933; Smith, 1953) und lassen keine Rückschlüsse auf definierte embryologische Vorgänge zu.

5.2.6 *Nematospiroides dubius* (= *Heligmosomoides polygyrus*)

Bei Anderson (1992) ist *N. dubius* als zugehörend zur Ordnung Strongylida, Superfamilie Trichostrongyloidea, Familie Heligmosomidae aufgeführt. Diese Einordnung stützt sich auf die Klassifizierung von Chitwood & Chitwood (1950) und Anderson *et al.* (1974-1983).

Heutzutage wechselt die Zugehörigkeit von *N. dubius* je nach Stammbaum zwischen der Superfamilie Heligmosomatoidea mit den Genera *Heligmosomum*, *Nematospiroides* und *Nippostrongylus* (National library of medicine, 2006) und der Superfamilie Trichostrongyloidea mit einer Vielzahl von Genera, darunter Heligmosomatidae (National Center for Biotechnology Information, 2006).

N. dubius gehört zu der Ordnung der Strongylida und ist somit Clade V von Blaxter *et al.* (1998) zuzurechnen (Abbildung 4.2).

5.2.6.1 Morphologie und Biologie von *N. dubius*

Die Beschreibung der Morphologie findet sich im Ergebniskapitel 8.3.1.

N. dubius ist ein Parasit des Duodenums von Mäusen. Er durchläuft einen direkten, einwirtigen Lebenszyklus von ca. 325 h (13,5 Tage) vom Ei zum Ei. Die Aufnahme der infektiösen L₃ erfolgt oral. Nach einer Entwicklungszeit von ca. 191 h innerhalb der intestinalen Mucosa sind die meisten Würmer wieder in Richtung Lumen ausgewandert, in dem sie ihre endgültige Position einnehmen. Ca. 240 h nach Infektion können die ersten Eier im Kot gefunden werden (Bryant, 1973). Die Eiproduktion in Mäusen dauert 4-11 Monate an (Cross, 1960). L₃ können bis zu 2,5 Jahre infektiös bleiben, wenn sie entsprechend gelagert werden (Weinstein *et al.*, 1969).

Sommerville & Bailey (1973) haben die Entscheidung von L₃ von *N. dubius* im Wirt beschrieben. Demnach verlieren die meisten Larven innerhalb von 5 min. im Magen der Mäuse ihre Hülle. Sie erhalten einen Stimulus vom Verdauungstrakt des Wirtes, der eine Veränderung der Larve hervorruft. Diese Veränderung führt zur Freisetzung eines Enzyms, das die äußere Hülle einreißen lässt, so dass die Häutung stattfinden kann. Es konnten Faktoren nachgewiesen werden, die für die Freisetzung dieses Enzym förderlich sind, darunter eine hohe Konzentration von H⁺-Ionen, eine Temperatur ähnlich der Körpertemperatur des Wirtes, ein hoher CO₂-Wert und ein pH-Wert zwischen 2 und 5. Das Auftreten von entwickelten Larven in Kotkulturen nach ungefähr 10 Tagen bei 20° C führen

Sommerville & Bailey auf hohe Konzentrationen an CO₂ zurück. Weitere Angaben über das Zusammenspiel verschiedener Parameter finden sich bei Cypess *et al.* (1973).

Die Entwicklungszeit bis zum Adulten ist stark abhängig von der Umgebungstemperatur. Teils voneinander abweichende Angaben finden sich bei den Autoren Spurlock (1943), Ehrenford (1954), Fahmy (1956), Dobson (1960) und Murau (1975).

5.2.6.2 Embryologie von *N. dubius*

Über die Embryologie von *N. dubius* ist sehr wenig bekannt. Die Beschreibung der Entwicklung beschränkt sich in der Literatur fast ausschließlich auf Larvalstadien. Die Vorgänge im Ei werden dagegen fast gänzlich ausgeklammert und finden nur Erwähnung im Zusammenhang mit Effekten durch Temperaturerhöhung und Schlupfzeiten (z. B. Yasuraoka & Weinstein, 1969).

Bei ihren Versuchen verbrachten Yasuraoka & Weinstein (1969) Eier verschiedener Stadien in 37° C, kein Embryo schlüpfte. Die Autoren stellten unter anderem fest, dass eine nur kurze Zeitspanne von 4-8 h in 37° C trotz anschließendem Verbringen nach 25° C die Eier schon so schädigt, dass die Schlupfrate deutlich verringert ist. Eier früher Stadien schienen dabei etwas weniger empfindlich gegenüber der hohen Temperatur zu sein. Waren die Eier 16 h lang 37° C ausgesetzt, fand kaum noch Schlupf statt. Bei 20 h Aufenthalt in 37° C starben alle Embryonen früher Stadien ab. Ähnliche Beobachtungen konnten in dieser Arbeit gemacht werden (Kapitel 8.3.2).

Die Dauer der Embryonalentwicklung und die Größe der Tiere hängen bei *N. dubius* sehr von der Umgebungstemperatur ab und es finden sich verschiedene Angaben zu Entwicklungszeiten und Häutungen bei unterschiedlichen Autoren (zum Beispiel Murau, 1975; Fahmy, 1956). Bryant (1973) vergleicht die teilweise voneinander abweichenden Angaben verschiedener Autoren miteinander, führt Begründungen für die Abweichungen an und stellt eigene Ergebnisse vor, die weitgehend mit den in dieser Arbeit dargestellten Angaben übereinstimmen (Kapitel 8.3.2).

5.2.7 *Nippostrongylus brasiliensis* (= *Heligmosomum muris*, *Nippostrongylus muris*)

N. brasiliensis gehört wie *N. dubius* zu der Ordnung der Strongylida und somit zu Clade V von Blaxter *et al.* (1998) (Abbildung 4.2).

In Anderson (1992) wird *N. brasiliensis* als zugehörig zur Ordnung Strongylida, Superfamilie Trichostrongyloidea, Familie Heligmonellidae, Subfamilie Nippostrongylinae aufgeführt (Einteilung basierend auf Chitwood & Chitwood, 1950 und Anderson *et al.*, 1974-1983).

Heutzutage wechselt die Zugehörigkeit von *N. brasiliensis* je nach Stammbaum zwischen der Superfamilie Heligmosomatoidea mit den Genera *Heligmosomum*, *Nematospiroides* und *Nippostrongylus* (National library of medicine, 2006) und der Superfamilie Trichostrongyloidea mit einer Vielzahl von Genera, darunter Heligmonellidae (National center for biotechnology information, 2006).

5.2.7.1 Morphologie und Biologie von *N. brasiliensis*

Die Beschreibung der Morphologie findet sich in dem Ergebniskapitel 8.4.1.

N. brasiliensis ist ein direkter, einwirtiger Parasit des Dünndarms von Ratten. Die adulten Tiere haben ihren Hauptsitz im Duodenum und Jejunum, seltener im oberen Ileum. Die Infektion mit der L₃ erfolgt perkutan oder oral. Bei der aktiven perkutanen Infektion findet eine zusätzliche Herz-Lunge-Trachea-Ösophagus-Passage statt, bevor sich die Tiere als L₄ im Darm ansiedeln können. Die letzte Häutung zum Adulten erfolgt ca. 100 h nach Infektion. Erste Eier im Kot können nach ca. 6 Tagen gefunden werden. Genauere zeitliche Angaben über die einzelnen Stationen der larvalen Wanderung finden sich bei Yokogawa (1922), Schwartz & Alicata (1934) und Twohy (1956).

5.2.7.2 Embryologie von *N. brasiliensis*

Auch über die Embryologie von *N. brasiliensis* ist sehr wenig bekannt. Die Entwicklung beschränkt sich in der Literatur fast ausschließlich auf Larvalstadien. Ausführlichere Angaben zu larvalen Häutungen sind unter anderem bei Schwartz & Alicata (1934), Lucker (1936), Weinstein & Jones (1956) und Haley (1961) zu finden.

5.2.8 *Trichinella spiralis*

Nach klassischer Einteilung gehört *T. spiralis* anders als die bisher untersuchten Nematoden zu der Klasse der Adenophorea. Die weitere Eingliederung erfolgt in die Ordnung Enoplida, Unterordnung Trichinellina. Die Superfamilie Trichinelloidea fasst die drei Familien Trichuridae, Cystoosidae und Trichinellidae, zu der *T. spiralis* gehört, zusammen (Anderson, 1992, basierend auf Anderson *et al.*, 1974-1983 und Chitwood & Chitwood, 1950).

Blaxter *et al.* (1998) rechnen *T. spiralis* nicht den Enoplia, sondern den Dorylaimia zu. Sie definieren zwei rein adenophoreische Claden. Clade I beinhaltet die Ordnung Trichocephalida mit *T. muris* und *T. spiralis*. Die Enoplia gehören hingegen zu Clade II (Abbildung 4.2). (Enoplea= Enoplia + Dorylaimia; Enoplia= Enoplida + Triplonchida; Vergleiche dazu auch De Ley, 2006).

5.2.8.1 Morphologie und Biologie von *T. spiralis*

T. spiralis unterscheidet sich als adenophoreischer Nematode deutlich von den bisher untersuchten Nematoden.

Als Mitglied der Superfamilie Trichinelloidea besitzt *T. spiralis* einen trichuroiden Ösophagus, der sich aus einem kurzen, muskulären anterioren Anteil und einem langen, glandulären posterioren Bereich, dem Stichosom, zusammensetzt (Abbildung 5.19, Abbildung 5.20, Abbildung 8.20b). Die einzelnen Stichocyten, bei *T. spiralis* 45-55 Zellen, liegen dorsal des Ösophagus und umschließen ihn fast vollständig. Ein Ductus führt von jeder Stichocyte ins Lumen des Ösophagus (Abbildung 5.18).

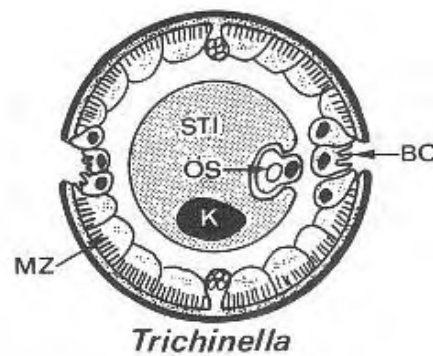


Abbildung 5.18: Querschnitt durch *Trichinella spiralis* auf Höhe des Stichosoms, entnommen aus Mehlhorn & Piekarski, 2002. BC=Bacillary cell, K=Kern, MZ=Muskelzelle, STI=Stichosom, ÖS=Ösophagus.

Weiteres Kennzeichen der Vertreter der Familien Trichuridae und Trichinellidae sind die entlang der lateralen Leisten der Hypodermis eingelagerten "bacillary cells" bzw. "hypodermal gland cells" (Abbildung 8.20 a). Die Zellen dieses Typs sind terminal stark aufgefaltet und haben einen nach außen mündenden Porus. Sie liegen jeweils neben einer Drüsenzelle, die Sekrete in den Porushof abgibt (Despommier & Müller, 1976; Chitwood, 1930) (Abbildung 5.18).

Das Männchen von *T. spiralis* (Abbildung 5.19) ist ca. 1,5 mm lang. Der Hoden ist unpaar und biegt am kaudalen Pol leicht um. Vesicula seminalis und Vas deferens schließen sich an und enden in einem Kloakalschlauch, der bei der Kopulation etwas ausgestülpt werden kann. Anders als bei *C. elegans* ist keine Rachis vorhanden, sondern das Keimepithel kleidet den gesamten Hoden aus, so dass er als hologen bezeichnet wird. Das Hinterende besitzt zwei blättchenförmige Klammerorgane, die als Kopulationshilfen dienen. Spicula sind nicht vorhanden. Die Spermien sind kugelig und ca. 10 µm groß (Mehlhorn & Piekarski, 2002).

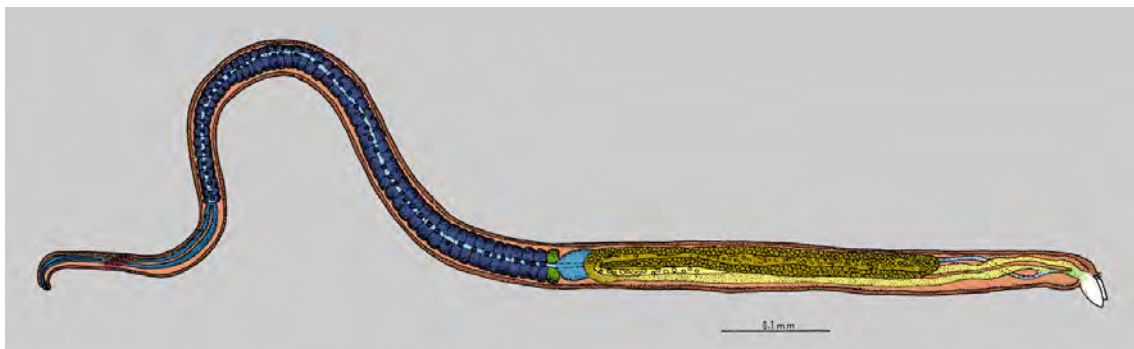


Abbildung 5.19: Adultes Männchen von *Trichinella spiralis*, entnommen von Villella, 1970, modifiziert von Despommier & Chen, 2004.

Das Weibchen (Abbildung 5.20) ist im Durchschnitt 3 bis 4 mm lang. Das Ovar ist unpaar und verläuft geradlinig. Es beginnt am kaudalen Körperende (Abbildung 8.20 c+d), geht in ein kurzes Ovidukt und dann in den Uterus über. Die kaudale Aussackung des Uterus dient

als Receptaculum seminis und ist mit Eiern und Spermien gefüllt. In Höhe des Ende des Pharynx mündet der Uterus in die Vulva (Abbildung 8.22 g). Das Ovar ist auf seiner gesamten Länge mit Keimepithel ausgekleidet. Der seitliche Abschnitt fungiert dabei als Nährepithel, an dem die Oocyten mit einem Pol festsitzen. Die Eireifung erfolgt in transversaler Richtung, so dass reife Oocyten ins Lumen geschoben werden. Diese Art der Eireifung bedingt eine unterschiedlich Größe von äußeren und mehr in Richtung Zentrum gelegenen Oocyten (Abbildung 8.20 d). Der Ovarientyp wird als hologen bezeichnet. Erste freie Oocyten sind nach 34 h p.i. im Ovar zu finden (Thomas, 1965).

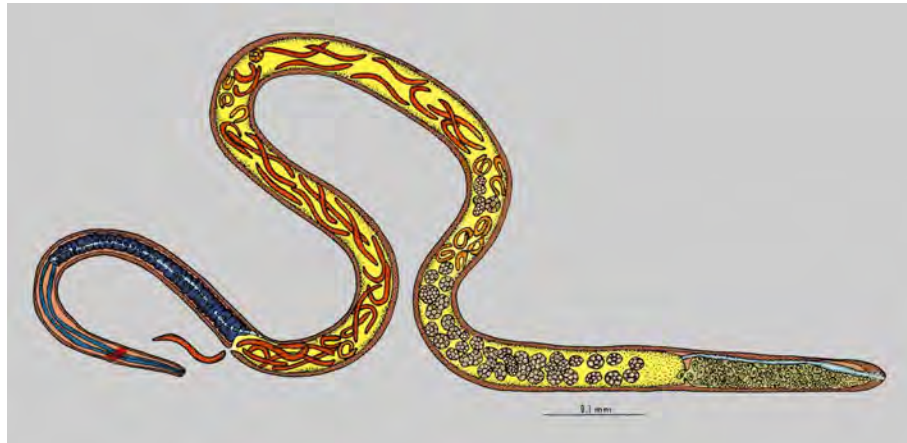


Abbildung 5.20: Adultes Weibchen von *Trichinella spiralis*, entnommen von Villella, 1970, modifiziert von Despommier & Chen, 2004.

T. spiralis ist ein Parasit ohne Außenphase. Die Infektion erfolgt durch die Aufnahme von kontaminiertem Fleisch. Die sich in Kapseln befindenden Muskelstadien werden im Magen vor allem durch die Einwirkung von Pepsin frei und siedeln sich in den Epithelzellen des Dünndarms, meist an der Basis der Zotten, an. Hier entwickeln sie sich zu Adulten weiter. Ab etwa dem 5. Tag p.i. (Thomas, 1965; Kozek, 1975; Eckert *et al.*, 2004) scheiden die Weibchen Larven aus. Die L₁ gelangen über Blut und Lymphe in Organe und die quergestreifte Muskulatur. In den für ihre Entwicklung ungeeigneten Organen sterben die Larven ab und können starke Entzündungsreaktionen hervorrufen (Eckert *et al.*, 2004). In der Muskulatur führen sie innerhalb weniger Woche zur Bildung eines “nurse cell-parasite-complexes“, der mit radikalen Veränderungen der Wirtszelle einhergeht. Innerhalb der dabei entstehenden Kapsel kann *T. spiralis* bis zu 30 Jahre infektiös bleiben (Capó *et al.*, 1998; Despommier, 1975, 1993, Despommier & Chen 2004; Ko *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1991; Purkerson & Despommier, 1974; Wright, 1989).

5.2.8.2 Embryologie von *T. spiralis*

Thomas (1965) beobachtete den zeitlichen Aspekt der Embryonalentwicklung. Knapp 35 h p.i. fand er das erste 2-Zellstadium, 9 h später ein 8-Zellstadium. 72 h p.i. konnte er eine längliche Gestalt im Ei ausmachen, die er jedoch nicht genauer beschrieb. 96 h p.i. ist das Hinterende des Embryos umgebogen und der Embryo zeigte lebhaft Bewegungen im Ei. Nach 120 h beobachtete er die erste larvengebärende Darmtrichinelle.

Weitere Informationen zur Embryogenese von *T. spiralis* sind nicht bekannt.

5.2.9 *Trichuris muris* (= *Trichocephalus muris*)

T. muris (= *Trichocephalus muris*, vor allem im russischsprachigen Raum) gehört wie *T. spiralis* nach klassischer Einteilung zu der Klasse der Adenophorea, Ordnung Enoplida, Unterordnung Trichinellina, Superfamilie Trichinelloidea. Eine der beiden Nachbarmfamilien der Trichinellidae ist die Familie Trichuridae, zu der *T. muris* gehört (Anderson, 1992 basierend auf Anderson *et al.*, 1974-1983 und Chitwood & Chitwood, 1950).

Nach Blaxter *et al.* (1998) ist *T. muris* kein Vertreter der Enoplida, sondern Mitglied von Clade I, einer von zwei rein adenophoreischen Claden. Clade I beinhaltet die Ordnung Trichocephalida, zu der *T. muris* und *T. spiralis* gehören. Die Enoplida dagegen tauchen in Clade II auf (Abbildung 4.2). (Enoplea= Enoplia + Dorylaimia; Enoplia= Enoplida + Triplonchida; Vergleiche dazu auch De Ley, 2006).

5.2.9.1 Morphologie und Biologie von *T. muris*

T. muris gehört zu den Peitschenwürmern und besitzt ein dünnes Vorderende (Peitsche) sowie ein dickeres Hinterende (Griff der Peitsche). Die Kutikula ist fein geringelt. Laterallinien ziehen längs des Tieres.

Wie alle Trichinelloidea besitzt *T. muris* einen trichuroiden Ösophagus mit kurzem, muskulärem, anteriorem Anteil und langem, glandulärem, posteriorem Stichosombereich. Der Ösophagus liegt als ein dünnes Rohr in einer Einfaltung der Stichocyten (Sheffield, 1963).

Weiteres Kennzeichen der Vertreter der Familie Trichuridae (und Trichinellidae) sind die lateral in die Hypodermis eingelagerten "bacillary cells" ("hypodermal gland cells"), die terminal stark aufgefaltet sind und einen nach außen mündenden Porus haben (Wright & Chan, 1973). Sie liegen jeweils neben einer Drüsenzelle, die Sekrete in den Porushof abgibt. Bei *Trichuris* sp. sind mehrere von ihnen zu einem "bacillary band" zusammengefasst (Chitwood, 1930) (Abbildung 5.21).

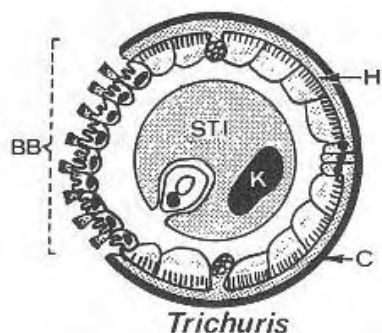


Abbildung 5.21: Querschnitt durch *Trichuris* sp. auf Höhe des Stichosoms, entnommen aus Mehlhorn & Piekarski, 2002. BB=Bacillary band, C=Cuticula, H=Hypodermis, K=Kern, STI=Stichosom.

Das Männchen von *T. muris* ist ca. 29 mm lang. Der Gonadenschlauch ist unpaar angelegt, setzt sich aus dem Hoden, der Vesicula seminalis und dem Vas deferens zusammen und mündet gemeinsam mit dem Rektum in die am oft eingerollten Körperhinterende gelegene Kloake. Es ist nur ein Spiculum vorhanden, das von einer vorwölbaren, bedornen Spiculumscheide umgeben ist (Abbildung 5.22).

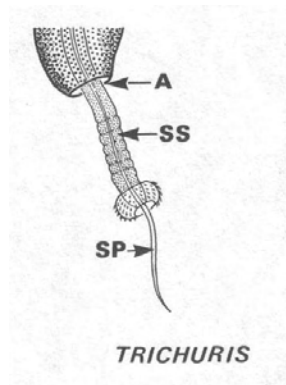


Abbildung 5.22: Männliches Hinterende von *Trichuris* sp., entnommen aus Mehlhorn & Piekarski, 2002. A=Anus, SP=Spiculum, SS=Spiculumscheide.

Wie bei *T. spiralis* ist auch bei *T. muris* keine zentrale Rachis im Gonadenschlauch vorhanden, sondern der gesamte Hoden ist mit Keimepithel ausgekleidet, so dass die Reifung der Spermatogonien transversal erfolgt. Die reifen Spermien sind ca. 5 µm groß.

Das Weibchen ist ungefähr 35 mm lang. Der Gonadenschlauch ist unpaar und setzt sich aus Ovar, Ovidukt, Uterus und Vulva zusammen. Das Receptaculum seminis ist mit Oocyten und Spermien gefüllt. Die Vulva befindet sich auf Höhe der Grenze zwischen dünnem und dickem Körperabschnitt. Das Ovar ist wie der Hoden hologonisch aufgebaut und besitzt somit keine Rachis (Preston & Jenkins, 1982). Das Weibchen hat einen kurzen, konisch zulaufenden Schwanz, an dessen Spitze der Anus liegt.

T. muris ist ein direkter, einwirtiger Parasit des Dickdarms von Mäusen.

Der Wirt infiziert sich mit larvenhaltigen Eiern. Die darin enthaltenen L₁ schlüpfen im Dünndarm, wandern zum Übergangsbereich vom Colon zum Caecum und dringen über die Lieberkühnschen Krypten in die Darmmukosa ein. Hier induziert das Kopfende die Bildung eines epithelialen Syncytiums, das als Nahrungsquelle benutzt wird, während der Wurm durch das Epithel mäandert und typische Gänge hinterläßt (Lee & Wright, 1978).

Innerhalb von etwa 1-3 Monaten entwickelt sich *T. muris* dabei über 4 Larvalstadien zum adulten Wurm. Es findet keine Körperwanderung statt. Zur Kopulation wird das dickere Hinterende so ausgebohrt, dass es sich frei im Lumen befindet, während das stichosomtragende, dünnere, peitschenartige Vorderende im Epithel verbleibt.

Die Eiablage beginnt ca. 36-43 Tage p.i. und dauert 4-5 Monate lang an (Mehlhorn & Piekarski, 2002). Die Eier embryonieren in der Außenwelt zum infektiösen, larvenhaltigem Ei.

Weitere Angaben zum Lebenszyklus von *T. muris* finden sich bei Shikhobalova, 1937; Fahmy, 1954 und Wakelin, 1969.

5.2.9.2 Embryologie von *T. muris*

Die Eier von *T. muris* haben ein charakteristisches Aussehen: die glatte, sehr dicke Schale formt an den Polen einen Kragen, in den eine pfropfartige Struktur (Operculum) eingelassen ist, so dass das Ei insgesamt zitronenförmig erscheint (Preston & Jenkins, 1985). Der Schlupf der L₁ erfolgt durch diese Struktur, wobei das Operculum mit einem Stilet durchstoßen wird (Panesar & Croll, 1980).

Aufgrund der verwandtschaftlichen Nähe von *T. muris* zu dem von Malakhov *et al.* (1984) untersuchten *Trichuris trichiura* (*Trichocephalus trichiurus*) und der Ähnlichkeit der Blastomere in Aussehen und Position ist die Benennung der Zellen von *T. muris* dieser Arbeit angelehnt.

Nach diesen Autoren ist die Verteilung der einzelnen Entwicklungsschicksale auf die Blastomere bei *T. trichiura* anders realisiert als bei anderen Nematoden. Zum einen gibt es mehr und andere somatische Gründerzellen als bei *C. elegans*. Zum anderen entstehen sie auf andere Weise. Während bei *C. elegans* bei Teilung einer Keimbahnzelle bis auf die Ausnahme der Entstehung von E und MS immer jeweils ein somatisches Schicksal abgespalten wird, werden bei *T. trichiura* bereits mit der Teilung von P₀ in P₁ und AESt nach Malakhov *et al.* (1984) drei Schicksale von der Keimbahnzelle abgetrennt. Im weiteren Verlauf werden daraus die drei somatischen Gründerzellen A, E und St. Das Darmschicksal ist also anders als bei *C. elegans* und den meisten untersuchten Nematoden mit der anterioren Blastomere des 2-Zellstadiums verknüpft. Die anderen Gründerzellschicksale von *T. trichiura* BM, C, D und F spalten sich dagegen wie bei *C. elegans* gewohnt direkt von der jeweiligen Keimbahnzelle ab.

Eine weitere Besonderheit gegenüber den meisten anderen Nematoden ist bei *T. trichiura* die frühe Teilung von P₄. Malakhov *et al.* (1984) bezeichnen die Töchter als F und P₅, gehen also von einer ungleichwertigen Teilung in eine somatische Zelle (F) und eine neue Keimbahnzelle (P₅) aus. Bewiesen werden konnte der Schicksalscharakter der beiden Zellen jedoch nicht.

Bei *C. elegans* bilden allein die Nachkommen der beiden Darmvorläufer E den Darm. Malakhov *et al.* (1984) nehmen für *T. trichiura* an, dass auch bei dieser Spezies der Darm aus E hervorgeht. Ob ausschließlich E-Nachkommen den Darm bilden oder ob auch andere Zelllinien beteiligt sind, wird nicht erwähnt.

Die Embryogenese von *T. muris* verläuft sehr langsam, ist jedoch stark temperaturabhängig. Sie beträgt bei 25° C 30 Tage (Fahmy, 1954) und kann bei 30° C auf 16-20 Tage (Shikhobalova, 1937; Shmytova, 1971) verkürzt werden.

6 Material und Methoden

6.1 Herkunft der Nematoden-Stämme

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*), Variation Bristol, bezeichnet als N₂, wurde 1973 von Prof. Dr. Sydney Brenner isoliert und seitdem in den vielen Laboren kultiviert.

Diploscapter coronatus (PDL 0010) wurde von Prof. Dr. Paul De Ley zur Verfügung gestellt.

Acrobeloides nanus (ES 501) wurde aus einer Bodenprobe aus Porto Maldonado, Peru, (Skiba & Schierenberg, 1992) isoliert und von Dr. Sven Boström (Department of Zoology, University of Stockholm, Schweden) bestimmt.

Der intern als „Herma-1“ bezeichnete hermaphroditische Cephalobide (PS 1146) stammt aus dem Labor von Prof Dr. Paul Sternberg, California Institute of Technology.

Hinsichtlich der Plectiden wurde am intensivsten an einer bis jetzt noch nicht klassifizierten *Plectus*-Spezies (ES 601), im weiteren als „*Plectus mekong*“ bezeichnet, geforscht. Sie wurde in einer Erdprobe des Mekong Ufers, Vietnam, gefunden. Trotz erheblicher Bemühungen konnte dieser Stamm bis jetzt keiner bekannten Spezies zugeordnet werden. Er scheint *Plectus sambesii*, beschrieben von Zell (1993) (Paul De Ley, persönliche Mitteilung) in vieler, aber nicht in jeder Hinsicht zu ähneln. Es besteht die Möglichkeit, dass er ein Vertreter einer bisher unbeschriebenen Spezies ist.

Weitere untersuchte Nematodenspezies sind: *Plectus acuminatus* (JB 125), *Plectus aquatilis* (PDL 0018), *Plectus minimus* (PDL 0012), *Anaplectus* sp. (PDL 0031), *Tylocephalus auriculatus* (PDL 0030), *Ereptonema arcticum* (PDL 1002), *Teratocephalus lirellus* (PDL 0011) *Rhabditis* sp. (ES 104) und *Protorhabditis* sp. (DF 505).

Spezies mit der Bezeichnung PDL stammen von Prof. Dr. Paul De Ley, solche mit der Bezeichnung JB von Prof. Dr. James Baldwin, beide Mitglieder der Universität von Kalifornien, Riverside. PS steht für Prof. Dr. Paul Sternberg, California Institute of Technology, Pasadena. ES bezeichnet Spezies aus dem Labor von Prof. Dr. Einhard Schierenberg, Universität Köln. DF ist die Abkürzung für Prof. Dr. David Fitch, New York University, Washington.

Alle parasitären Nematoden stammen aus dem Landwirtschaftszentrum Monheim der Bayer AG und wurden dankenswerterweise von Dr. Harder und Frau Moll zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um Stämme von *Heterakis spumosa*, *Nematospiroides dubius*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Trichuris muris* und *Trichinella spiralis*.

Leider fiel ein Teil der Arbeit an den parasitären Nematoden in die Zeit, in der die gesamte Zucht oben genannter Nematoden vom Landwirtschaftszentrum wegen Firmenumstrukturierung aufgegeben wurde. Die Stämme wurden entweder an andere Forschungseinrichtungen weitergegeben oder vernichtet. Der verwendete Stamm von

Trichuris muris wurde dem Labor von Prof. Dr. Mehlhorn der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf überlassen. Bedauerlicherweise versiegte diese Quelle jedoch nach kurzer Zusammenarbeit, so dass dieser Teil der Arbeit nicht fortgeführt werden konnte.

6.2 Medien zur Zucht freilebender Nematoden

6.2.1 *E. coli*-Anzucht (nach Brenner, 1974)

E. coli (Stamm OP 50, uracilbedürftig) dient den im Labor gehaltenen, freilebenden Nematoden als Nahrungsquelle. Die Nährlösung für diese Bakterien wird folgendermaßen hergestellt werden.

0,01 g	Uracil
5,0 g	NaCl
20 g	Pepton

werden in 1 l Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt und die Lösung autoklaviert (20 min, 129° C). Das Animpfen erfolgt mit ausgeglühter Impföse aus Einzelkolonien von *E. coli*. Die Bakterien werden über Nacht im Schüttelbad bei 37° C kultiviert.

6.2.2 Herstellung von salzhaltigen Agarplatten (nach Brenner, 1974)

2,5 g	Select Pepton 140 (Gibco BRL, Eggenstein)
3,0 g	NaCl
20,0 g	Agar (Serva, Heidelberg)

werden in Aqua dest. gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wird autoklaviert. Nach kurzem Abkühlen werden folgende sterile Stammlösungen zugesetzt:

1,0 ml	0,5% Cholesterin (Serva, Heidelberg) gelöst in 95% Ethanol
0,5 ml	1M CaCl ₂ -Lösung
1,0 ml	1M MgSO ₄ -Lösung
25,0 ml	1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6

Der Agar wird unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Nach Erkalten des Agars werden die Platten so mit dicht gewachsener *E. coli*-Suspension angeimpft, dass etwa die Hälfte der Agarfläche bedeckt ist. Die Platten werden trocknen gelassen und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei ca. 6° C gelagert.

6.2.3 Herstellung von Agarplatten ohne Zugabe von Salzen (*Plectus*-Platten)

Im Unterschied zu salzhaltigen Agarplatten werden bei den sogenannten *Plectus*-Platten, die vorwiegend für Plectiden benutzt werden, keine Salze hinzugegeben. In 500 ml Aqua dest. werden 10 g Agar gelöst. Die Lösung wird bei 130° C 20 min autoklaviert. Nach Abkühlen

werden 0,5 ml einer Lösung, bestehend aus 0,4 g Cholesterin auf 80 ml Äthanol (95%) zugesetzt.

6.2.4 Reinigung mit Glutaraldehyd

Um Nematodeneier von den sie umgebenden Bakterien zu reinigen, wird zunächst eine Lösung aus 50 µl 25% Glutaraldehyd und 200 µl PBS angesetzt. Die verschmutzten Eier werden mit einer ausgezogenen Pasteurpipette von der Platte gesammelt und für 3-5 min in einen kleinen Tropfen der hergestellten Lösung verbracht. Anschließend können die Eier auf eine neue Agarplatte überführt werden.

6.3 Zucht freilebender Nematoden

Rhabditiden und Cephalobiden werden auf salzhaltigen Platten gehalten, während Plectiden *Plectus*-Platten benötigen.

Ausgehend von einer Ursprungsplatte, werden die Nematoden auf neue Platten überführt, indem die Tiere mit einem Zahnstocher oder mit einer Insektennadel angehoben und auf der neuen Platte abgesetzt werden.

Um schneller mehr Tiere zu überführen, kann mit einem ausgeglühten Skalpell auch ein kleines Agarstück aus der alten Platte ausgeschnitten werden und mit der bewachsenen Seite nach unten auf die neue Platte verbracht werden.

Bei *D. coronatus* und *P. aquatilis* empfiehlt es sich, das Agarstück zusätzlich mit einigen Tropfen autoklavierten Leitungswassers zu befeuchten, da diese Arten dazu tendieren, unter dem Agarstück zu verbleiben und erst bei genügender Umgebungsfeuchte von dem Überimpfungsort wegstechen. Auch für das weitere Hochwachsen der Nematoden ist das Feuchthalten der Platten vorteilhaft, da sich vor allem *D. coronatus* bei Trockenheit bald in den Agar verkriecht, was ein späteres Herunterpicken erheblich erschwert.

6.4 Zucht und Isolierung parasitärer Nematoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten parasitären Stämme wurden im Landwirtschaftszentrum Monheim der Bayer AG bei Leverkusen bzw. im Labor von Prof. Dr. Mehlhorn der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet. Ratten bzw. Mäuse wurden hierfür mit infektiösen Stadien des jeweiligen Parasiten infiziert und nach Erreichen seines Adultstadiums durch Kohlendioxidbegasung getötet. Die Tiere wurden seziiert und die eiertragenden Adulten aus dem jeweiligen Hauptsitz im Darm isoliert. Die mikroskopische Untersuchung fand mit Ausnahme von *T. spiralis* im Zoologischen Institut der Universität Köln statt.

Als Medium für den Transport wurden Leitungswasser, PBS und Ringerlösung ausprobiert, wobei sich Letzteres bewährte. Von den getesteten Temperaturen (ca. 25°, 18°, 10°, 4° C) ergab der Transport bei 4° C die größte Schonung der Eier und Tiere.

Die isolierten Tiere zeigten schon nach etwa einstündigem Aufenthalt außerhalb des Wirtes Zersetzungserscheinungen, die sich bei der mikroskopischen Untersuchung als

abnehmende Integrität der noch lebenden Würmer und mangelnde Abgrenzbarkeit ihrer inneren Strukturen äußerten.

Die extreme Veränderung der Umwelt durch die Entnahme bewirkte ein recht unterschiedliches Verhalten der einzelnen Spezies. Während einige Adulte (*N. brasiliensis*, *N. dubius*) 1-2 Tage ohne Wirt überlebten und während dieser Zeit eine Vielzahl von entwicklungsfähigen Eiern absetzten, entwickelten sich die Eier von *T. spiralis* nach Verlust des Wirtes selbst innerhalb des Elterntieres nicht weiter.

Insgesamt ließ sich beobachten, dass Eier, die vor dem Verlassen des Wirtes eine frühe kritische Phase in der Embryonalentwicklung durchlaufen hatten, sich auch außerhalb des Wirtes im Elterntier und nach Herausschneiden auch außerhalb des Elterntieres als Präparat unter dem Mikroskop zu intakten Larven entwickelten. Eier hingegen, die erst nach dem Verlust des Wirtes produziert worden sind und bei denen sich das Elterntier also während der ersten Zellteilungen schon außerhalb des Wirtes befand, entwickelten sich nur fehlerhaft oder gar nicht weiter.

Auf diese Weise war der Zugriff auf geeignete Stadien recht eingeschränkt. Teilweise konnte Kühlung die Embryonalentwicklung verzögern oder stoppen. Diese Methode funktionierte jedoch nicht bei allen Spezies.

6.4.1 Anzucht und Isolierung von *H. spumosa*

Im Landwirtschaftszentrum Monheim der Bayer AG werden Mäuse durch eine Suspension, die vollständig embryonierte Eier enthält, mit *H. spumosa* infiziert.

Die Suspension wird im Kühlschrank aufbewahrt. Die in den Eiern enthaltenen Larven bleiben bis zu 10 Monate infektiös. Bis zur Aufnahme durch den Wirt befinden sich die Larven im Ruhestadium. Erst mit dem Schlupf, der im Darm des Wirtes stattfindet, werden die Tiere wieder aktiv. 48 bis 72 h nach der Infektion befinden sich die Larven im oberen Dünndarm. In den folgenden Tagen nehmen die Tiere ihren Hauptsitz auf den ersten Zentimetern im Colon ein und entwickeln sich dort zu eiertragenden Adulten.

Zwischen dem 38. und dem 58. p.i. wird der Wirt getötet, die Nematoden werden entnommen und in Ringerlösung verbracht. Um Vorkernstadien zu beobachten, wurden die Eier aus dem Elterntier herausgeschnitten. Für alle übrigen Untersuchungen wurden gelegte Eier verwendet.

6.4.2 Anzucht und Isolierung von *N. dubius*

Mäuse wurden mit einer Suspension, die L₃ von *N. dubius* enthielt, infiziert. Zwischen dem 28. und 42. Tag post infectionem wurden die Wirtstiere getötet, die eiertragenden Adulten aus dem Duodenum isoliert und in zimmerwarme Ringerlösung verbracht.

Die Weibchen legen noch einige Tage außerhalb des Wirtes entwicklungsfähige Eier ab. Die Furchung der Eier beginnt bei *N. dubius* allerdings schon im Elterntier. Um an geeignete Zellstadien für die Untersuchungen zu gelangen, mussten die Gonade wie bei *C. elegans* mit einem Skalpell eröffnet und die 1-Zellstadien mit einer Pipette abgesammelt werden.

6.4.3 Anzucht und Isolierung von *N. brasiliensis*

Ratten wurden mit einer L₃-haltigen Suspension von *N. brasiliensis* oral infiziert. Zwischen dem 7. und 10. Tag p. i. wurden die Wirtstiere getötet, die eiertragenden Weibchen aus dem Duodenum und Jejunum isoliert und in zimmerwarme PBS-Lösung verbracht.

Das Weibchen legt noch mehrere Tage außerhalb des Wirtes entwicklungsfähige Eier. Wie bei *N. dubius* werden die Eier jedoch nicht im 1-Zellstadium abgelegt, so dass die Gonade eröffnet werden muss, um an niedrige Stadien zu gelangen.

6.4.4 Anzucht und Isolierung von *T. spiralis*

Mäuse wurden mit einer Suspension, die Muskelstadien von *T. spiralis* enthielt, oral infiziert.

Da die Eier sich außerhalb des Wirtes nicht weiterentwickeln (Kapitel 6.4), wurde *T. spiralis*, um an geeignete Stadien zu gelangen, unterschiedlich lange zur Entwicklung in der Maus belassen, bevor der Wirt getötet wurde. Nach 28 h bis 4 Tagen p.i. wurden die Wirtstiere getötet und die Würmer wurden aus dem längsseitig geöffneten Duodenum in zimmerwarme Ringerlösung ausgewaschen.

Um an frühe Embryonalstadien dieser viviparen Spezies zu gelangen, muss die Gonade eröffnet werden. Vor der Anfertigung der mikroskopischen Präparate ist es ratsam, eine Formalinfixierung zur Festigung durchzuführen. Ohne Stabilisierung halten die sehr dünne Schale und der Embryo dem Druck des aufgelegten Deckgläschens nicht stand und werden durch es zerdrückt.

6.4.5 Anzucht und Isolierung von *T. muris*

Die verwendeten Eier von *T. muris* stammen aus dem Labor von Prof. Dr. Mehlhorn der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Sie wurden dort ca. ab dem 40. Tag p.i. aus Mäusekot isoliert, indem der Kot mehrmals mit Ringerlösung versetzt und durch eine Gaze filtriert wurde. Die Eier wurden dann in Ringerlösung als 1-Zellstadien ans Zoologische Institut Köln gesandt. Bis zur Verwendung wurden sie im Kühlschrank bei 4° C gelagert. Bei dieser Temperatur wird die Embryonalentwicklung reversibel unterbrochen.

6.5 Feststellung des Fortpflanzungsmodus bei freilebenden Nematoden

Bei Nematoden kommen parthenogenetische, hermaphroditische und getrenntgeschlechtliche Fortpflanzung vor. Für die erfolgreiche Zucht von Nematoden ist es nötig zu wissen, welcher Mechanismus bei der jeweiligen Spezies vorliegt.

Um eine getrenntgeschlechtliche Fortpflanzungsweise zu erkennen, werden die Kulturen der verschiedenen Spezies zunächst mit Hilfe eines Binokulars auf Vorkommen von Männchen untersucht.

Spezies, bei denen sich Männchen und Weibchen nur wenig voneinander unterscheiden, Weibchen, Hermaphroditen und parthenogenetische Tiere können jedoch durch Betrachtung mit einem Binokulars nicht voneinander unterschieden werden.

Weitere Aufschlüsse bieten Kultivierungsversuche.

Hierzu werden 10 Agarplatten mit jeweils einem juvenilen Tier beimpft und nach einigen Tagen auf stattgefundene Vermehrung kontrolliert. Durch die Auswahl von Larvalstadien statt adulter Tiere wurde eine evtl. bereits stattgefundene Befruchtung ausgeschlossen.

Bei ausbleibender Reproduktion liegt eine getrenntgeschlechtliche Fortpflanzungsweise vor. Hat jedoch eine Vermehrung stattgefunden, kann eine getrenntgeschlechtliche Reproduktionsweise auf jeden Fall ausgeschlossen werden, da sich auf jeder Platte nur ein einziges Tier befand.

Um eine parthenogenetische von einer hermaphroditischen Reproduktion unterscheiden zu können, werden die verschiedenen Spezies mit Hilfe eines Mikroskops auf das Vorhandensein von Spermien untersucht. Da es sich bei den Hermaphroditen um protandrische Zwitter handelt, also in den Geschlechtsorganen zuerst Spermien und danach Eier heranreifen, wird bei L₄-Larven im gesamten Gonadenschlauch und bei jungen Adulten in dem Bereich, der eine Spermatheka beinhalten würde, nach Spermien gesucht.

Bei einer bereits stattgefundenen Umschaltung von Spermien- auf Oocytenproduktion fänden sich bei einem hermaphroditischen Reproduktionsweg Spermien als Vorrat in der Spermatheka und könnten dort leicht gefunden werden. Es empfiehlt sich, nicht zu alte Tiere auszuwählen, bei denen der Spermiovorrat in der Spermatheka schon aufgebraucht sein könnte. Zwitter könnten ansonsten leicht für parthenogenetische Tiere gehalten werden.

Eine weitere Absicherung für einen parthenogenetischen Reproduktionsweg stellt die Untersuchung der Eier innerhalb des Elterntieres auf Fehlen eines zweiten bzw. männlichen Vorkernes dar. Hätte man tatsächlich bei allen vorangegangenen Untersuchungen Spermien übersehen, müsste bei einer hermaphroditischen Fortpflanzungsweise zumindest ein zweiter Vorkern bzw. die Vorkernverschmelzung erkennbar sein.

Um hierfür einzelne Tiere über einen längeren Zeitraum beobachten zu können, werden von „*P. mekong*“ und *D. coronatus* Agarpräparate (jeweils n=8) angefertigt. Das zu beobachtende Ei wird innerhalb des Elterntieres unter ständigem Durchfokussieren von einer in der Biegung des Gonadenschlauches befindlichen Position bis zum Erreichen des 2-Zellstadiums auf das Auftreten eines männlichen Vorkernes untersucht.

6.6 Anfertigung von Präparaten

6.6.1 Beschichtung von Objektträgern

6.6.1.1 Herstellung von Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern (Cole & Schierenberg, 1986)

Es werden 200 ml Aqua dest. auf 60° C erwärmt und 400 mg Gelatine (Sigma, Deisenhofen) darin gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf 40° C werden 40 mg CrK(SO₄)₂ x 12 H₂O

hinzugegeben und anschließend 1 mg/ml Poly-L-Lysin (Sigma, Deisenhofen; MG>300.000) darin gelöst. Die Lösung ist nach 12 h gebrauchsfertig und kann im Kühlschrank etwa ein Jahr gelagert werden.

Zur Herstellung Poly-L-Lysin beschichteter Objektträger wird ein kleiner Tropfen (etwa 10 µl) auf einen fettfreien Objektträger gleichmäßig mit einer waagrecht gehaltenen Pasteurpipette ausgestrichen und luftgetrocknet. Die so beschichteten Objektträger sollten möglichst am selbem oder am folgendem Tag verwendet werden.

Diese Art der Beschichtung ist vor allem für die spätere Herausnahme einzelner Blastomeren, bei Austausch von Medien und bei Antikörperfärbungen sinnvoll.

6.6.1.2 Herstellung von mit Agar-beschichteten Objektträgern

Eine 3-5 %-ige Agarlösung in Aqua dest. beziehungsweise autoklaviertem Leitungswasser wird im Wasserbad so lange aufgekocht, bis sie klar erscheint. Einige Tropfen werden auf einen Objektträger gegeben und durch Auflegen eines weiteren Objektträgers gespreitet. In einer Feuchtekammer können die so beschichteten Objektträger ca. 2 h aufgehoben werden.

Für einige Versuche, z.B. bei langen Entwicklungszeiten um ein Austrocknen zu verhindern, ist es sinnvoll, ein etwas dickeres Agarpad herzustellen. Hierzu werden rechts und links neben den zu betrefenden Objektträger mit Isolierband beklebte Objektträger als Abstandshalter platziert. Auf diese Weise erhält der aufzulegende Objektträger einen größeren Abstand zum ersten Objektträger, so dass das Agarpad dicker wird und mehr Feuchtigkeit speichern kann. Kurz vor der Benutzung lässt man den zweiten Objektträger wieder abgleiten, so dass die Embryonen nun auf das freigelegte Agarpad übertragen werden können.

Diese Art der Beschichtung ist vor allem für Laserablationen und Langzeitaufzeichnungen der Embryonalentwicklung geeignet.

6.6.2 Gewinnung von Embryonen

Bei den untersuchten Cephalobiden (*A. nanus*, „Herma-1“), *D. coronatus*, *Protorhabditis* sp. und den Plectiden werden die Eier im 1-Zellstadium abgelegt, so dass man in diesen Fällen die Eier direkt von der Platte sammeln kann.

Hierzu werden die Platten zunächst mit autoklaviertem Leitungswasser überspült. Anschließend werden unter dem Binokular Embryonen des gewünschten Stadiums ausgewählt und mit einer ausgezogenen Pasteurpipette, verbunden mit Plastikschauch, Filter und Mundstück, aufgesaugt.

Da die Haftung der Eier an Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern auf elektrostatischen Anziehungskräften beruht, werden die Embryonen in einem zweiten Schritt in Aqua dest. gespült, bevor sie auf einen beschichteten Objektträger verbracht werden.

Bei der Verbringung auf mit Agar beschichtete Objektträger können die Eier auch in Leitungswasser gespült werden. Vor allem bei *D. coronatus* hat sich dies für die spätere Entwicklung als vorteilhaft erwiesen.

Bei *H. spumosa* und *T. muris* werden die Eier ebenfalls im 1-Zellstadium abgelegt. Sie können durch wahlloses Zerteilen der Würmer mit dem Skalpell auf einem Objektträger am besten in Leitungswasser massenhaft freigesetzt werden.

Bei *C. elegans*, *N. dubius* und *N. brasiliensis* werden die Embryonen in höherzelligen Stadien abgelegt, so dass auch hier die Gonade in Medium eröffnet werden muss, um an 1-Zellstadien zu gelangen. Da unterschiedlich weit entwickelte Eier freigesetzt werden, müssen die gewünschten Stadien zusätzlich aus den anderen ausgewählt werden. Bei *C. elegans* dient Aqua dest. hier nicht nur als Medium für die Würmer, sondern ermöglicht auch ein zahlenmäßig besseres Freisetzen als andere Medien. Bei den beiden parasitären Spezies eignet sich Leitungswasser am besten.

Nach Freisetzen der Eier können die gewünschten Stadien mit einer Pasteurpipette wie oben beschrieben abgesaugt werden.

6.6.3 Versiegelung der Präparate

Welche Größe das Deckgläschen hat, hängt wesentlich von der Stabilität der Eier bzw. von dem Gewicht des Deckgläschens ab. In der Regel werden 24 mm x 24 mm Gläschen verwendet. Sie werden an zwei gegenüberliegenden Kanten mit Vaseline als Abstandshalter bestrichen, auf den Objektträger aufgelegt und leicht angedrückt, so dass sich der Flüssigkeitstropfen, in dem die Eier liegen, an der Unterseite des Deckgläschens fängt.

Die Flüssigkeitssäule zwischen Eiern und Deckgläschen sollte dabei möglichst dünn sein. Anschließend wird das Deckglas auch an den übrigen beiden Kanten mit Vaseline versiegelt, um ein Austrocknen des Präparates zu verhindern.

6.7 Manipulationen von Embryonen

6.7.1 Ausgangslösungen für die Herstellung der Zellkulturmedien

Die meisten der verwendeten Medienkomponenten stammen von Sigma (Deisenhofen) und sind vom Hersteller als geeignet für die Zellkultur ausgewiesen: „cell culture tested“ oder „embryo tested“. In diesen Fällen wird auch die Bestellnummer in Klammern angegeben, um die Identifikation der Zutaten zu vereinfachen.

6.7.1.1 Zellkulturwasser

Alle Lösungen werden mit speziellem, für die Kultur von Embryonen getestetem, sterilem Reinstwasser (W-1503) angesetzt.

6.7.1.2 Basen-Lösung

In 100 ml Zellkulturwasser werden

100 mg Adenin	10 mg Adenosintriphosphat (A-6419)
3 mg Guanin	3 mg Hypoxanthin (H-9636)
3 mg Thymin (T-0895)	3 mg Xanthin (X-2001)

3 mg Uridin (U-3003)

5 mg Ribose

5 mg Desoxyribose

gelöst.

Die Zutaten ohne Bestellnummer stammen aus dem Biochemischen Institut der Universität Köln und sind in Bezug auf ihre Reinheit nicht weiter charakterisiert. Die Lösung ist autoklaviert bei 4° C unbegrenzt haltbar.

6.7.1.3 Inulin-Lösung

Inulin (I-3754) wird mit 5 mg/ml in Zellkulturwasser eingerührt und durch Autoklavieren in Lösung gebracht. Aliquots werden bei 4° C gelagert.

6.7.1.4 Galactose-Lösung

D(+)-Galactose (G-5388) wird mit 100 mg/ml in Zellkulturwasser gelöst und autoklaviert. Aliquots werden bei 4° C gelagert.

6.7.1.5 Salz-Stammlösung

In 100 ml Zellkulturwasser werden 4,1 g NaCl und 2,2 g KCl gelöst und autoklaviert. Die Aliquots sind bei 4° C unbegrenzt haltbar.

6.7.1.6 Hühnereidotter

Frische Hühnereier werden aufgeschlagen, Eiweiß und Eigelb getrennt. Durch vorsichtiges Rollen des Eigelbes auf einem Papiertuch werden Eiweißreste weitgehend entfernt. Kleine Mengen Eidotter werden 1:1 mit Zellkulturwasser verdünnt und gründlich gemischt. Diese Eidottersuspension wird immer frisch angesetzt.

6.7.1.7 Fetal calf serum (FCS)

Die Zusammensetzung fetalen Kälberserums unterliegt als Naturprodukt Schwankungen, die die Qualität eines Zellkulturmediums entscheidend beeinflussen können. Mehrere Chargen FCS wurden auf ihre Eignung an isolierten Blastomeren von *C. elegans* getestet. Beurteilt wurden das Aussehen der Zellen, ihr Teilungsverhalten und ihr Differenzierungsvermögen. Beste Ergebnisse wurden mit FCS von Sigma (F-7524, Charge: 64H3386) erzielt. Dieses Serum wurde in allen Versuchen verwendet. Hitzeinaktivierte Aliquots (30 min im Wasserbad bei 56° C) wurden bei –20° C gelagert, am Versuchstag aufgetaut und den Medien zugesetzt.

6.7.2 Zellkulturmedien

Embryonen werden in speziellen Zellkulturmedien kultiviert, um annähernd physiologische Bedingungen für die Blastomeren auch bei eröffneter Eischale und verletzter Vitellinmembran zu gewährleisten. Die eingesetzten Medien ermöglichen die Aufrechterhaltung der Entwicklung und einen Verschluss der unter der Eischale gelegenen Vitellinmembran. Dieser Verschluss begünstigt eine Differenzierung embryonaler Zellen. Die

verwendeten Medien wurden für *C. elegans* entwickelt (Edgar, 1995). Je nach Versuchssituation werden zwei verschiedene Rezepturen embryonaler Zellkulturmedien eingesetzt:

6.7.2.1 Trypanblau-Medium (TBM)

Dieses Medium wird an jedem Versuchstag frisch aus den folgenden Komponenten angesetzt.

600 µl	L-15 Leibovitz-Medium (Gibco BRL, Eggenstein)
100 µl	HEPES (0,25M; pH 7,4) (Gibco BRL, Eggenstein)
100 µl	Inulin-Lösung
10 µl	Basen-Lösung
10 µl	Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL, Eggenstein)
200 µl	FCS

8 mg Trypanblau (T-6146) werden zugesetzt und mit den anderen Medien gründlich vermischt. Präzipitate werden in der Eppendorf-Zentrifuge (5 min, 14.000 U/min) abzentrifugiert.

6.7.2.2 Embryonic growth medium (EGM) (Edgar, 1995)

Die einzelnen Zutaten werden in folgender Reihenfolge gemischt:

50 mg	Polyvinylpyrrolidon (P-0930)
0,5 mg	L-Tyrosin (T-1145)
840 µl	Salz-Stammlösung
1000 µl	HEPES (0,25M; pH 7,4) (Gibco BRL, Eggenstein)
1000 µl	Inulin-Lösung
600 µl	Grace's Aminosäure-Stammlösung, 10-fach (G-0273)
1970 µl	Zellkulturwasser
100 µl	Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL, Eggenstein)
100 µl	Galactose-Lösung
100 µl	Basen-Lösung
100 µl	L-Glutamin (G-5763; 14 mg/ml) frisch angesetzt in Zellkulturwasser
50 µl	BME-Vitamine (B-6891)
40 µl	0,5M Na ₂ HPO ₄ in Zellkulturwasser
20 µl	Pyruvat (P-4562; 14 mg/ml) frisch angesetzt in Zellkulturwasser
20 µl	1M CaCl ₂ in Zellkulturwasser

20 µl	1M MgSO ₄ in Zellkulturwasser
10 µl	Lactat-Sirup (L-4263)
50 µl	Hühnereidotter

Diese Lösung wird 3 h auf Eis ruhen gelassen und anschließend 5 min bei 5000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wird sterilfiltriert und aliquotiert. Die Aliquots sind für mehrere Monate bei 4° C haltbar. Unmittelbar vor Gebrauch werden 40 % FCS zugesetzt.

6.7.3 Möglichkeiten der Lasermanipulation

Mit der Lasermikrostrahltechnik besteht einerseits die Möglichkeit, ohne Eröffnung der Eischale und somit unter Vermeidung von äußeren Einflüssen die einzelne Blastomeren entweder subletal zu schädigen oder gezielt abzutöten.

Andererseits kann durch Veränderung der Beschussparameter und gezielte Wahl des umgebenden Mediums die Eischale eröffnet werden, so dass einzelne Blastomeren aus dem Zellverband entnommen werden können. Bei diesem Versuchsaufbau wird durch Akkumulation des Laserstrahls an einem Pol ein Loch in die Eischale gebrannt. Durch die folgende Zellentnahme wird auch die Vitellinmembran kurzzeitig eröffnet.

Vor allem bei einer sehr spröden und wenig elastischen Vitellinmembran erfolgt der Wiederverschluss verzögert und oft nicht vollständig, so dass das umgebende Medium eindringen kann. Um diese die Entwicklung störenden Einflüsse so gering wie möglich zu halten, muss ein Zellkulturmedium zugegeben werden, das annähernd physiologische Bedingungen für die Blastomeren auch bei eröffneter Eischale und verletzter Vitellinmembran gewährleistet (siehe Zellkulturmedien).

6.7.3.1 Technische Daten und Aufbau des Lasers

Sämtliche Laserexperimente werden mit einem Laser der Firma Photonic Instruments, St. Charles II. durchgeführt. Als Laserfarbstoff wird Coumarin mit einem Absorptionsmaximum von 453 nm verwendet.

Das Lasergerät ist mit einem Glasfaserkabel mit dem Leica DMLB Mikroskop verbunden. Der Strahl selbst wird durch das Mikroskop auf das Objekt geleitet und kann mit einem Stoppfilter, der in den Strahlengang geschoben werden kann, ein- und ausgestellt werden. Durch verschiedene Einstellmöglichkeiten wird der Laser in allen drei Raumrichtungen sowie in seiner Streubreite justiert.

Um die Qualität des Laserstrahls abschätzen zu können, wird ein mit schwarzem, permanentem Filzstift beschichteter Objektträger verwendet. Auf die Farbschicht werden 17 µm Wasser verbracht und anschließend ein Deckgläschen aufgelegt. Form und Größe der Lasereinschläge können durch die Farbabspregungen während des Laserbeschusses beurteilt werden. Ein Fadenkreuz im Okular des Mikroskops erleichtert den Beschuss des Präparats an richtiger Stelle.

6.7.3.2 Versuchsablauf bei subletaler Schädigung oder Laserablation einzelner Blastomeren

Zunächst wird ein Präparat mit Embryonen auf einem Poly-L-Lysin- oder Agar-beschichteten Objektträger hergestellt. Um die Energie zur Schädigung der Blastomere nicht mehr als nötig durch Streuung des Laserstrahls im Zellkulturmedium oberhalb des Embryos und im Cytoplasma der Zelle zu reduzieren, ist eine gute Quetschung der Embryonen unter dem Deckgläschen nötig. Bei einem 24 mm x 24 mm Deckgläschen sollte deswegen eine Flüssigkeitsmenge von 17 µm nicht überschritten werden.

Nach Einstellung der Optik wird der durch das Mikroskop geleitete Laserstrahl auf den zu schädigenden oder ablatierenden Zellkern fokussiert. Damit die im Fall einer Ablation gewünschte Unterbindung der Signalgebung, die in der Regel in der Mitte des Zellzyklus der jeweiligen Blastomere erfolgt, verhindert wird, ist darauf zu achten, dass mit der Laserbestrahlung möglichst früh im Zellzyklus, am besten im G₁-Stadium der Interphase, begonnen wird. Mit Hilfe der Feinfokussierung und durch Verstellen des Objektisches in X-Y-Richtung wird der Zellkern in seiner gesamten Ausdehnung bestrahlt. Die aufzuwendende Intensität und Dauer der Bestrahlung hängen vor allem von speziesspezifischen Parametern wie Dicke und Struktur der Eischale sowie Körnung des Cytoplasmas und von dem zu behandelnden Zelltyp ab.

Grundsätzlich wechseln sich während einer Laserbestrahlung sowohl bei Versuchen mit subletaler Schädigung als auch bei Ablationsversuchen Phasen der Bestrahlung mit Phasen der Pause bzw. Abkühlung ab. Auf diese Weise wird eine Aufheizung und somit Schädigung der umliegenden Zellen vermieden und der Defekt auf die gewünschte Zelle beschränkt.

Bei *D. coronatus* werden mit dem oben genannten Laser bei optimaler Einstellung bei Somazellen 8-10 Serien mit jeweils 30 s Bestrahlung und 30 s Pause benötigt, um eine vollständige Ablation zu erzielen. Bei den einer Laserbestrahlung gegenüber empfindlicheren Keimbahnzellen können die Phasen der Bestrahlung verkürzt werden.

Bei *C. elegans* mit einer wesentlich dünneren Schale und feineren Körnung der cytoplasmatischen Granula, reichen für eine Ablation vier Serien mit je 20 s Beschuss und 40 s Pause.

Durch den gegenüber einer subletalen Schädigung intensiveren Laserbeschuss bei einer Ablation wird der betreffende Zellkern meist derart deformiert, dass er seine scharfe Kontur verliert und sich seine Körnung verändert. Oftmals zerfließt der Kern auch. Diese Anzeichen weisen schon während der Bestrahlung auf eine ausreichende Schädigung hin. Die Ablation ist erfolgreich, wenn keine Zellteilung der beschossenen Zelle mehr stattfindet.

Bei Versuchen, in denen Zellen nur subletal geschädigt werden, steht meist eine Verzögerung der Zellteilung einer Zelllinie und somit Einflussnahme auf die Reihenfolge der Zellteilungen im gesamten Embryo im Mittelpunkt. Bestimmte Blastomeren können durch den Beschuss in ihrer Zellteilungsgeschwindigkeit verlangsamt werden, so dass ihr Verhalten im veränderten nachbarschaftlichen Umfeld beobachtet werden kann und

entwicklungsrelevante Ereignisse von der im physiologischen Fall vorliegenden Zellzahl entkoppelt werden können.

Je nachdem, wann und wie oft sich die behandelte Blastomere wieder teilen soll, muss man die Zelle mal mehr mal weniger schwerwiegend schädigen. Bei der subletalen Schädigung der E-Zelle von *C. elegans* und der daraus folgenden Verzögerung der Zellteilung um eine Runde wurden vier Serien mit je 15 s Beschuss und 45 s Pause verwendet.

6.7.3.3 Eröffnung der Eihülle mit Hilfe des Lasermikrostrahls

Die Eröffnung der Eihülle sollte so früh wie möglich erfolgen. Bei Embryonen mit konstanter Lage der Polkörper wie *C. elegans* kann dies schon im 1-Zellstadium erfolgen. Zu diesem Zeitpunkt ist der Spalt zwischen Embryo und Vitellinmembran bzw. Eischale noch recht groß, so dass relativ problemlos gelasert werden kann, ohne den Embryo zu schädigen. Bei anderen Spezies erfolgt die Eröffnung, sobald die Orientierung deutlich ist.

Zunächst wird ein Präparat mit einem Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger angefertigt, ohne jedoch ein Deckgläschen aufzulegen. Nach Absinken der Eier und Kontrolle der Anheftung am Objektträger wird so viel Flüssigkeit wie möglich abgesaugt und durch 20 µl Trypanblau-Medium (TBM) ersetzt. Der im Medium enthaltene Farbstoff Trypanblau haftet an der Eihülle und erlaubt so die Absorption des komplementär gefärbten Laserstrahls. Das Präparat wird anschließend mit einem 24 mm x 24 mm Deckglas, das mit zwei Kanten durch Vaseline abgestützt wird, eingedeckelt.

Der Laserstrahl wird auf die Schale des der Entnahmeseite gegenüberliegenden Eipols fokussiert, um dort mit kurzen Laserpulsen ein kleines Entlastungsloch in die Eischale zu brennen. Auf diese Weise rutscht der gesamte Embryo auf die Einschussstelle zu, so dass an dem Eipol der späteren Zellentnahme eine genügend große Lücke für ein Entnahmeloch geschaffen wird. Anschließend kann mit erhöhter Laserleistung ein ausreichend großes Loch für die Zellentnahme in die Schale gebrannt werden.

Da mit TBM zwar eine bessere Absorption der Laserenergie an der Eihülle erreicht wird, EGM jedoch die Entwicklung der Embryonen und den Wiederverschluss der Vitellinmembran besser unterstützt, werden anschließend 40 µl EGM mit Filterpapier unter dem Deckglas durchgesaugt, um das trypanblauhaltige Medium auszuwaschen. Danach kann das Deckgläschen an allen Kanten mit Vaseline versiegelt werden. Bis zum Erreichen des zur Entnahme erforderlichen Zellstadiums werden die Embryonen in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. EGM wurde speziell für *C. elegans* entwickelt, so dass hinsichtlich der Unterstützung der Entwicklung bei anderen Spezies einige Abstriche in Kauf genommen werden müssen.

6.7.3.4 Entfernung einzelner Blastomeren nach Eröffnung der Eihülle

Nach Erreichen des erforderlichen Zellstadiums werden einzelne Blastomeren nach der von Schierenberg und Wood (1985) beschriebenen Methode aus den mit Hilfe des Laserstrahls eröffneten Eiern entfernt. Durch vorsichtigen, nach und nach zunehmenden Druck mit einer Insektennadel auf das Deckglas werden die Embryonen unter Sichtkontrolle am Mikroskop

oder am Binokular soweit deformiert, dass die dem größeren Entnahmeloche nächstliegende Zelle durch die Öffnung in der Eischale herausgedrückt wird. Dabei tritt zunächst nur ein kleiner Teil der Zelle wie ein Bläschen nach außen. Durch Variieren der Druckstärke bei nie vollständiger Entlastung rutscht der restliche Teil der Zelle nach, bis schließlich die gesamte Zelle ausgetreten ist.

Wichtige Voraussetzung ist eine vollständige Versiegelung des Objektträgers, so dass keine Flüssigkeit während des Drückens unter dem Deckglas austreten kann. Da die Embryonen sehr druckempfindlich sind, würden sie ansonsten leicht zerquetscht werden. Das endgültige Ablösen der Zelle erfolgt durch leichten, in schnellen Intervallen wiederholten Druck in Form von „Tippen“ auf das Deckglas. Auf diese Weise beginnt die ausgetretene Zelle um die Austrittsöffnung zu pendeln, bis schließlich die verbindende Cytoplasmabrücke reißt und die Zelle frei im Medium schwimmt.

Die zu entfernende Zelle muß unbedingt in ihrer Gesamtheit erhalten bleiben, ihre Membran darf während des Herausdrückens nicht einreißen. Ist die Zelle erst einmal beschädigt, kann sie nicht mehr als Ganzes entfernt werden, sondern läuft aus. Die Vitellinmembran kann sich wegen anhaftender Cytoplasmareste der beschädigten Zelle nicht mehr vollständig um den verbleibenden Embryo schließen, was die weitere Entwicklung meist bis zum Stillstand stört.

Nach gelungener Entfernung der Zelle wird die weitere Entwicklung bei Raumtemperatur auf Videoband aufgezeichnet.

6.8 Antikörpermarkierungen durch indirekte Immunfluoreszenz (verändert nach Strome, 1986)

6.8.1 Lösungen

6.8.1.1 PBS-Puffer (Brenner, 1974)

In 1 l Aqua dest. werden

8,77 g	NaCl (150mM)
2,24 g	KCl (30mM)
0,69 g	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (5mM)
1,79 g	NaH ₂ PO ₄ x 12 H ₂ O (5mM)

gelöst. Der pH-Wert wird mit HCl bzw. NaOH auf 7,4 eingestellt.

6.8.1.2 Waschpuffer

Zur Herstellung von Waschpuffer wird PBS mit 0,1% Tween 20 versetzt.

6.8.1.3 Antikörper

Als primäre Antikörper dienen monoklonale Antikörper, die gegen verschiedene Antigene bei *C. elegans* gerichtet sind:

- ICB4 gegen Darm, "intestinal rectal valve cells", sensorische Nervenzellen, Spermien Verdünnung 1:5 (Okamoto & Thomson, 1985)
- K76 und L416 gegen keimbahnspezifische Granula (P-Granula)
Verdünnung 1:10 (Strome & Wood, 1983)

Sie sind in Waschpuffer mit 5% FCS und 0,1% NaN_3 gelöst.

Als sekundärer Antikörper wird ein Kaninchen-anti-Maus-Antikörper verwendet, der mit DTAF (Dichlorotriazin-Fluorescein) als Fluorochrom konjugiert ist (Dianova, Hamburg, Verdünnung 1:50). Er ist in Waschpuffer mit 0,1% NaN_3 Zusatz gelöst.

6.8.2 Ablauf der Antikörpermarkierung

Embryonen werden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgeklebt und in etwa 20 μl Aqua dest. mit Vaseline-gestütztem Deckglas eingedeckelt.

Zur Fixierung werden die Objektträger für 15 min in flüssigen Stickstoff getaucht. In gefrorenem Zustand werden die Deckgläser mit Hilfe eines Skalpells abgesprengt und die Präparate für jeweils 30 min in tiefgekühltes (-20°C) 99,8% Methanol und tiefgekühltes 99,5% Aceton überführt.

Anschließend werden die Objektträger an der Luft getrocknet und einmal kurz in PBS sowie einmal 15 min in Waschpuffer gewaschen. Nachfolgend werden die Präparate für 30 min mit 5 %-iger FCS-Lösung in Waschpuffer überdeckt, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Danach werden die Objektträger einmal 10 min in Waschpuffer gewaschen. Ihre anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgt über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C . Je Objektträger werden 20 μl Antikörperlösung benutzt.

Am nächsten Tag folgen zunächst 4 Waschschrte mit Waschpuffer für je 15 min. Die Inkubation mit sekundärem Antikörper erfolgt für 3 h bei 37°C in dunkler, feuchter Kammer. Danach werden die Objektträger 6 x 10 min in Waschpuffer gewaschen.

Für eine Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne werden die Präparate für 10 min mit in Waschpuffer gelöstem (0,8 mg/ml) DAPI (Diamidino-2-phenylindol) inkubiert.

Abschließend werden die Objektträger in 15 μl PBS mit 1 mg/ml p-Phenylendiamin (Sigma, Deisenhofen) als Ausbleichschutz (Johnson & de Nogueira Araujo, 1981) eingedeckt. Die Auswertung der Präparate erfolgt am Fluoreszenzmikroskop.

6.9 Nachweis von Darmzellendifferenzierung

Markierung mit Acridinorange

Darmzellen von *C. elegans* sind in der Lage, Granula aus dem Darmlumen aufzunehmen und als Speicherstoff an die Oocyten weiterzugeben. Werden die Tiere mit Bakterien gefüttert, die zuvor mit Acridinorange versetzt wurden, wird dieser fluoreszierende Marker mitsamt den Granula über die Darmzellen in die Oocyten transportiert. In der zweiten Hälfte

der Embryogenese werden die so anfangs in allen Blastomeren des Embryos vorhandenen markierten Granula von den sich differenzierenden Darmzellen endozytiert, dort akkumuliert und verschwinden aus allen anderen Blastomeren (Bossinger & Schierenberg 1992, 1996 a). Die Fähigkeit zur Endozytose ist ein wichtiges Charakteristikum der sich differenzierenden E-Zellen und dient unter anderem als Indikator für eine Zellschicksalsänderung nach Ablation (Wiegner, 1998; Wiegner & Schierenberg, 1998).

Um cytoplasmatischen Transfer aus dem Darm über den Gonadenschlauch in die Oocyten nachweisen zu können, werden Agarplatten zunächst mit 0,01% Acridinorange in Aqua dest. überschichtet. Nachdem die Platten getrocknet sind, werden junge adulte Nematoden übertragen. Zusammen mit den als Nahrung dienenden Bakterien wird der Farbstoff von den Tieren aufgenommen. Nach einigen Tagen können die ersten so markierten Eier von der Platte bzw. durch Zerschneiden der Würmer gewonnen werden. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop.

Nachweis der IVC mit dem Antikörper ICB4

Bei *C. elegans* ist der Darm mit dem Rektum über eine intestinal-rektale Klappe, die aus 2 "intestinal rectal valve cells" (IVC) besteht, verbunden (Sulston *et al.*, 1983; Bowerman *et al.*, 1992). Sowohl Darm als auch die IVC können mit dem monoklonalen Antikörper ICB4 angefärbt werden. Die IVC stammen von ABp ab und können als Marker für eine stattgefundene Induktion der ABp durch P₂ dienen (Priess & Thomson, 1987).

6.10 Mikroskopie, Lineageanalysen und Dokumentation

Die Auswertung und Dokumentation erfolgt mit Hilfe der Differential-Interferenz-Kontrastmikroskopie (DIK, Nomarskioptik) an einem Leica DMLB Mikroskop mit den Öl-Immersionsobjektiven Leica PL Fluotar 40x/1.00-0.50 OIL und Leica PL Fluotar 100x/1.30-0.60 OIL bei einer Raumtemperatur von 22° C ± 2° C.

Embryonen werden dabei je nach Versuchssituation auf Poly-L-Lysin- oder Agar-beschichtete Objektträger aufgetragen. Die Entwicklung wird mit einer Videokamera (SW CCD, Modell BC 12, AVT-Horn) auf einen Monitor (Monacor CDM –1200/SW) übertragen und bei jeweils für die Spezies und die Versuchssituation geeigneter Zeitraffung (12-480-fach) mit einem VHS Time-Lapse Videorekorder (Mitsubishi HS S5600) auf Standard VHS-Videobänder aufgezeichnet. Bei Langzeitaufnahmen wird ein Rotfilter zur Verminderung langwelliges Lichtes auf die Lichtquelle des Mikroskops gelegt.

Bei der Nomarskioptik zeichnen sich die Zellkerne gegenüber dem lichtbrechenderem Cytoplasma als Vertiefung ab und können so als Zellmarker verwendet werden.

Um das Verhalten einzelner Zellen und Zellgruppen während der Entwicklung auch in verschiedenen Fokusebenen verfolgen zu können, wird der Feintrieb des Mikroskops über eine Hebelmechanik mit einem in Amplitude und Frequenz anpassbaren Gleichstrommotor verbunden. Auf diese Weise wird durch ein kontinuierliches Auf-und Abfokussieren durch

den Embryo über den gesamten Aufnahmezeitraum eine räumliche Darstellung aller Zellen über die Zeit erreicht. (Schierenberg *et al.*, 1984).

Mit Hilfe der DIK (geringe Tiefenschärfe) kann der Embryo so in eine Serie optischer Schnitte zerlegt werden. Die Verringerung der gleichzeitig zu verarbeitenden Daten ist notwendig, weil die zunehmende Zahl an morphologisch gleichartigen Zellkernen es unmöglich macht, alle Zellen des Embryos simultan zu verfolgen (Schierenberg, 1987 a).

Mit der beschriebenen Methode bleiben einzelne Zellen auch dann beobachtbar, wenn sie sich durch Zellbewegungen in eine andere Fokusebene verlagern.

Die Auswertung der Fluoreszenzpräparate erfolgt ebenfalls am Leica DMLB Mikroskop mit den beiden oben genannten Öl-Immersionsobjektiven. Zur Fluoreszenzanregung dient eine Quecksilberhöchstdrucklampe (HBO 100 W/2, Osram). Durch verschiedene Anregungsfilter, die zusammen mit einem Strahlenteiler und einem Sperrfilter in den Strahlengang eingeschoben werden, können unterschiedliche Fluorochrome angeregt werden. Dabei werden für FITC und DTAF blaues Licht von 450-490 nm Wellenlänge (ergibt Grünfluoreszenz), für Acridinorange grünes Licht von 530-560 nm (ergibt Rot-orange-Fluoreszenz) und für DAPI UV-Licht von 340-380 nm (ergibt Blaufluoreszenz) zur Anregung verwendet. Die Fluoreszenzverteilung selbst wird während der Entwicklung der Embryonen durch nur kurzes Öffnen des Stoppfilters ermittelt.

Die Dokumentation erfolgt mit einer Panasonic CCD Kamera, die an eine Kamera-Kontrolleinheit (Camera Control Unit WV-CU 204 Panasonic) angeschlossen ist und von dieser angesteuert wird. Auf diese Weise kann eine bis zu 32-fache Verstärkung der Fluoreszenzsignale erreicht werden.

Die auf Videoband aufgezeichneten Bilder werden mit einem Videoprinter (Video Copy Processor P66E, Mitsubishi) auf Thermodruckerpapier (K65 HM-CE, Mitsubishi) ausgedruckt, eingescannt und am Computer verarbeitet.

6.11 Datenerhebung und computergestützte Rekonstruktionen

Mit der im Kapitel 6.10 beschriebenen Methode erhält man bereits einen guten Einblick in die räumliche Musterbildung bei verschiedenen Spezies der Nematoden.

Der Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass jeweils nur eine Fokussierungsebene des Embryos betrachtet werden kann, wenn auch durch die Einbindung des Motors und das kontinuierliche Durchfokussieren ein 3-dimensionaler Eindruck entsteht.

Mit Hilfe einer computergestützten Aufbereitung der so gewonnenen Daten können jedoch räumliche Modelle von Embryonen zu beliebigen Zeitpunkten der Entwicklung angefertigt werden.

Hierzu wird zunächst die relative Position jeden Zellkernes hinsichtlich seiner x- und y-Koordinate und seiner maximalen Ausdehnung aus Videoaufzeichnungen bestimmt. In der Praxis wird dabei eine Folie vor den Monitor gehängt und während einer Auf- und Abfokussierung die Position der Eischale und aller Zellkerne mit Folienschreiber markiert. Um die Ausdehnung der Schale und die Position der Zellkerne innerhalb des Embryos, also

die z-Koordinate, zu ermitteln und um die Zellkerne in Abhängigkeit zueinander zu setzen, bewegt man sich mit Hilfe des Einzelbildvorlaufs durch den Embryo und zählt, wie viele Schritte benötigt werden, um von einem Zellkern zum folgenden zu gelangen. Nachdem die sinusförmige Verteilung der z-Koordinaten, die durch die Bewegung des durchfokussierenden Motors geliefert wird, in eine lineare Verteilung umgerechnet worden ist, kann mit der Computerrekonstruktion des Embryos begonnen werden.

Das Programm Bryce 4 (Corel Corp., Ottawa) liefert die für diese Zwecke geeigneten Funktionen: Auf einer Arbeitsoberfläche können neben anderen geometrischen Figuren Kugeln entworfen werden, die frei im Raum platzierbar sind. Für jeden Zellkern der zuvor am Monitor entstandenen Folie wird eine Kugel an entsprechender Stelle innerhalb der entworfenen Eischale kreiert. Die Farbgebung der Kugeln richtet sich nach der Zelllinie, der die jeweilige Zelle angehört. Alle Nachkommen einer Zelllinie haben somit die gleiche Farbe. Die AB-Zelllinie ist in anteriore und posteriore Nachkommen unterteilt.

Farbkodierung der Gründerzellen bzw. ihrer Nachkommen:

ABa = blau ABp = blau-weiß kariert EMS = orange MS = braun
E = gelb C = grün D = pink Keimbahn P₁ bis P₄ = rot

Um rechte und linke Anteile jeder Zelllinie im Embryo darstellen zu können, wurde für Zellen, die die linke Seite des Embryos begründen, ein dunklerer Farbton als für die Zellen der rechten Seite verwendet.

Auf diese Weise entsteht nach und nach ein Kugelmodell, das die räumliche Anordnung der Zellen eines Embryos zu einem bestimmten Zeitpunkt seiner Entwicklung wiedergibt. Sind alle Zellkerne durch Kugeln nachgestellt, kann das Modell um alle drei Raumachsen frei gedreht und so der virtuelle Embryo von allen Seiten betrachtet und ausgewertet werden. So ist das Modell unabhängig von der ursprünglichen Lage des Embryos im Versuch und Abweichungen von der Standardausrichtung können ausgeglichen werden.

Die schwarze Linie in Abbildung 7.34, Abbildung 7.35, Abbildung 7.36 und Abbildung 7.37 symbolisiert die aus den Symmetrieachsen der einzelnen Zelllinien gemittelte bilaterale Symmetrieachse der gesamten rechten und linken Anteile des Embryos.

Aus Gründen der Übersicht und um eine Überlagerung mit den Nachkommen der anderen Zelllinien zu vermeiden, wurden die AB-Zellen in den jeweiligen Abbildungen E und F weggelassen.

6.12 Narkotisierung von Würmern mit 1-Phenoxy-2-propanol (PPX)

Die Mehrzahl der untersuchten Spezies legt ihre Eier im 1-Zellstadium ab. Für bestimmte Fragestellungen in Bezug auf die Orientierung der anterior-posterior-Achse des Embryos im Elterntier, ist es jedoch nötig zu verhindern, dass die Eier abgelegt werden, so dass sie ihre Embryogenese im Elterntier beginnen.

Durch Verbringen von eiertragenden Adulten in 0,045% 1-Phenoxy-2-propanol (PPX) kann die Vulvamuskulatur gelähmt werden, so dass sich Eier im Gonadenschlauch anhäufen. Bei der Lähmung der Legemuskulatur beziehungsweise bei manchen Spezies auch der

gesamten Körpermuskulatur handelt es sich um einen reversiblen Prozess, der weder die Würmer noch ihre Eier schädigt. Verbringt man die Tiere zurück in narkosemittelfreies Medium, nehmen sie ihre Legetätigkeit wieder auf und bewegen sich wieder.

Auch unter normalen Bedingungen kommt die zurückgehende Legetätigkeit bei älteren Tieren immer wieder vor. Die Anzahl solcher Tiere ist allerdings für die Versuche zu gering.

6.13 Variation der Entwicklungstemperatur bei *D. coronatus*

Zur Überprüfung der Entwicklungsdauer von *D. coronatus* bei einer Temperatur höher als der Raumtemperatur wird auf ein Zeiss–Universal-Mikroskop ein heizbarer Objektträgertisch von Zeiss aufgeschraubt. Durch je einen zu- und ableitenden Schlauch, die an ein Wasserbad mit Heiz- und Kühlvorrichtung angeschlossen sind, wird der gesamte Tisch von Wasser durchflossen und kann so auf die gewünschte Temperatur eingestellt werden. Auf diese Weise kann eine relativ konstante Temperatur von $\pm 0,5^\circ \text{C}$ erreicht werden.

Zur Überprüfung der Temperatur eines Präparates wird ein Testobjektträger angefertigt, bei dem der Fühler eines elektronischen Thermometers zur Messung von Betriebstemperaturen von Prozessoren zwischen Objektträger und Deckglas befestigt wird.

Der weitere Aufbau zur Dokumentation erfolgt wie in Kapitel 6.10. Die verwendeten Objektive bei diesem Mikroskop trugen die Bezeichnungen Plan 10/0,22 160/-, Plan 40/0,63 160/0,17, Neofluar 63/1,25 Oil 160/- und Plan 100/1,25 Oil 160/-. Zur Übertragung des Videosignals wurde eine AVT-Horn Kamera benutzt.

7 Ergebnisse der Untersuchung freilebender Nematoden

Abgesehen von Kapitel 7.1, das als Einführungskapitel dienen soll, werden im Folgenden die embryologischen Prozesse in der Reihenfolge dargestellt wie sie auch natürlicherweise ablaufen.

7.1 Morphologische Voruntersuchungen und embryologische Grundlagen freilebender Nematoden

In diesem Kapitel werden einige wesentliche Aspekte der verschiedenen untersuchten Nematoden-Spezies hinsichtlich ihrer Morphologie, Biologie und Embryonalentwicklung vorgestellt. Es dient als Übersicht der untersuchten Nematodenspezies und liefert zugleich die Grundlagen für die wegen ihrer Komplexität in weiteren Ergebniskapiteln gesondert dargestellten embryologischen Prozesse.

7.1.1 *D. coronatus* als phylogenetisch naher Verwandter von *C. elegans*

Mit einer Größe von 550 bis 690 μm ist der adulte *D. coronatus* kleiner als *C. elegans*. Die Legeleistung ist deutlich geringer, die Spitzen beinhalten jeweils nur wenige Oogonien. In jedem Arm des Gonadenschlauches reift immer nur ein Ei heran, das zunächst ohne feste Schale sehr langgestreckt ist und einen sehr großen Teil des Armes beansprucht. Auf dem weiteren Weg in Richtung Vulva kontrahiert sich das Ei zunehmend und gewinnt an Form. Kurz vor der Vulva, in der das Ei recht lange liegen bleibt, wird eine feste Eischale gebildet (Abbildung 7.1).



Abbildung 7.1: Adulter *D. coronatus*. * Oocyten. Nomarskiopik, Eichstrich: 10 μm

Die Eier werden abwechselnd aus dem linken und rechten Gonadenarm gelegt und sind mit einer Größe von durchschnittlich 42 μm x 21 μm recht klein. Sie haben eine dickere Schale als bei *C. elegans*, was sich vor allem beim Lasern als hinderlich erweist. Auch wird das Licht bei mikroskopischen Aufnahmen an einer dickeren Schale stärker gestreut, so dass die Bilder nicht die von *C. elegans* gewohnte Schärfe und Auflösung erreichen. Das Cytoplasma weist gröbere Granula auf als bei *C. elegans* (Abbildung 7.2).

Der Wurm und auch die Eier selbst zeigen eine relativ große Resistenz gegenüber hohen Temperaturen und können anders als *C. elegans* auch jenseits der 25° C ihre Entwicklung ungestört fortsetzen. Das Maximum für die Embryonalentwicklung insgesamt liegt bei 31° C wenn die Embryonen sich auf einem Objektträger mit Deckglas befinden. Besonders sehr

junge Stadien haben sich dabei empfindlich gegenüber ansteigenden Temperaturen gezeigt. Ist das 2-Zellstadium jedoch erst einmal durchlaufen, ist die weitere Embryonalentwicklung wieder unkritischer.

Auf Agarplatten in einem Brutschrank können auch Temperaturen bis maximal 33° C ausgehalten werden. Bei weiterem Temperaturanstieg, vorausgesetzt die Erhöhung hat erst nach dem 2-Zellstadium stattgefunden, bleiben die Embryonen zunächst in späten Morphogenesestadien, meist im späten Kaulquappenstadium, stecken. Diese Diskrepanz zwischen Entwicklung auf einem Objektträger und Entwicklung auf Agarplatte ist möglicherweise dem erhöhten Sauerstoffverbrauch besonders höherer beweglicher Stadien zuzuschreiben.

D. coronatus pflanzt sich parthenogenetisch fort. Männchen konnten zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Die gesamte Embryogenese vom Legen des Eies bis zum Schlupf der L₁ dauert bei Zimmertemperatur (22° ± 2° C) im Mittel 60 h (52 – 68 h), wobei die Hälfte bis zu 2/3 der Zeit für die Entwicklung vom Brezelstadium bis zum Schlupf in Anspruch genommen wird. Somit dauert die Embryogenese von *D. coronatus* bis zu 5,5 mal länger als bei *C. elegans*. Bei Erhöhung der Entwicklungstemperatur auf 32° C verkürzt sich die Gesamtentwicklung auf 21-25 h, wobei vor allem die lange Phase vom Brezelstadium bis zum Schlupf auf 3-6 h verkürzt ist.

In Abbildung 7.2 werden einige für *D. coronatus* typische Embryonalstadien gezeigt.

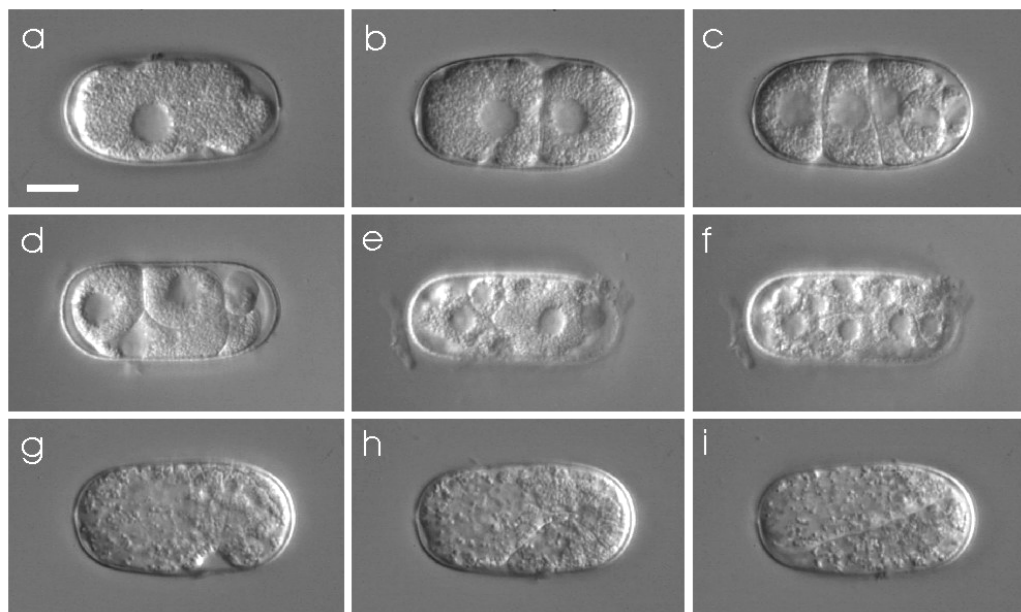


Abbildung 7.2: Typische Stadien der Embryonalentwicklung von *D. coronatus*. (a) 1-Zellstadium, (b) 2-Zellstadium, (c) frühes 5-Zellstadium, (d) spätes 5-Zellstadium, Teilung der kleinsten Zelle P₃, (e) ca. 20-Zellstadium mit großer E-Zelle, (f) ca. 30-Zellstadium, Ea und Ep während der Einwanderung, (g) Bohnenstadium, ca. 16 h nach Eiablage, (h) Kaulquappenstadium, ca. 19 h nach Eiablage, (i) frühes Pflaumenstadium, ca. 21 h nach Eiablage. Orientierung a-d, g-i Lateralansicht, anterior=links, dorsal=oben. e und f schräg ventrale Ansicht. Nomarskioptik, Eichstrich: 10 µm

Durch fortlaufende Teilung der ersten Zelle P_0 entlang der anterior-posterior Achse und einer weiteren Teilung der somatischen Zelle EMS in MS und E gehen nach und nach wie bei *C. elegans* fünf somatische Gründerzellen und die Urkeimzelle P_4 hervor. Es werden einzelne Zelllinien mit unterschiedlichen Zellzykluslängen etabliert. Obwohl die Teilungen in ihrer Gesamtheit bei den meisten Spezies nicht viel weiter als bis zum 50-Zellstadium verfolgt wurden, ähnelt das Verhalten der Zellen sehr denen von *C. elegans*, so dass gemäß der bestehenden Nomenklatur die somatischen Gründerzellen AB, MS, E, C, D und die Keimbahnzellen P_0 bis P_4 definiert wurden.

Das Zellteilungsmuster ist wie bei *C. elegans* konstant und invariabel und kann so in einer Tabelle festgehalten werden (Tabelle 2).

<i>Diploscapter coronatus</i>		
Zelle in Teilung	Zellstadium	Zeit/min 21° C
P_0	2	0
P_1	3	47
$^1AB^2$	4	61
P_2	5	108
$^2AB^4$	7	180
P_3	8	189
EMS	9	216
$^4AB^8$	13	260
$^1MS^2$	14	314
$^8AB^{16}$	22	344
$^1C^2$	23	359
P_4	24	375
$^1E^2$	25	382
$^2MS^4$	27	399
$^{16}AB^{32}$	43	424
$^2C^4$	45	471
$^4MS^8$	49	490
$^2E^4$	51	523

Tabelle 2: Abfolge der Zellteilungen bei *D. coronatus*. Grau unterlegtes Feld markiert den Beginn der Gastrulation.

Die Zeiten sind jeweils für eine Umgebungstemperatur von $21^\circ \pm 2^\circ$ C ermittelt worden.

Die Angehörigen der Zelllinien zeigen über einen kurzen Zeitraum Variationen in der räumlichen Musterbildung, welche in den Kapiteln 7.6.1.1 und 7.6.1.2 behandelt werden.

Nach ungefähr 17 h bei Zimmertemperatur ist die Proliferationsphase mit dem Erreichen des Bohnenstadiums abgeschlossen und die Morphogenese beginnt (Abbildung 7.2 g-i). Es folgen wie bei *C. elegans* Komma-, Kaulquappen-, Pflaumen-, Brezel- und Schlingenstadium und schließlich der Schlupf der L_1 .

7.1.2 Acrobeloiden als Vertreter der Cephalobiden

Die morphologischen und embryologischen Grundlagen der Gruppe der Acrobeloiden mit den Vertretern *A. nanus* und „Herma-1“ sind in der Literatur hinreichend beschrieben. Die in dieser Arbeit gemachten Eingangsuntersuchungen decken sich mit den dort aufgeführten Beobachtungen und werden hier deshalb nicht mehr angeführt.

7.1.3 Einige Genera der Plectiden

Mit *Plectus*, *Anaplectus*, *Tylocephalus* und *Ereptonema* werden hier einige Genera der Familie Plectidae untersucht. Den Schwerpunkt der Untersuchungen bilden *Plectus*- und *Anaplectus*-Spezies. *Tylocephalus auriculatus* und *Ereptonema arcticum* ähneln jedoch hinsichtlich Zellteilungssequenz, Symmetriebildung und Gastrulation diesen beiden Genera (Lahl *et al.*, 2003).

Charakteristische Merkmale der Plectiden sind Form und Kutikularisierung der Mundhöhle und das Vorkommen von Borsten und Amphiden (Abbildung 7.3).

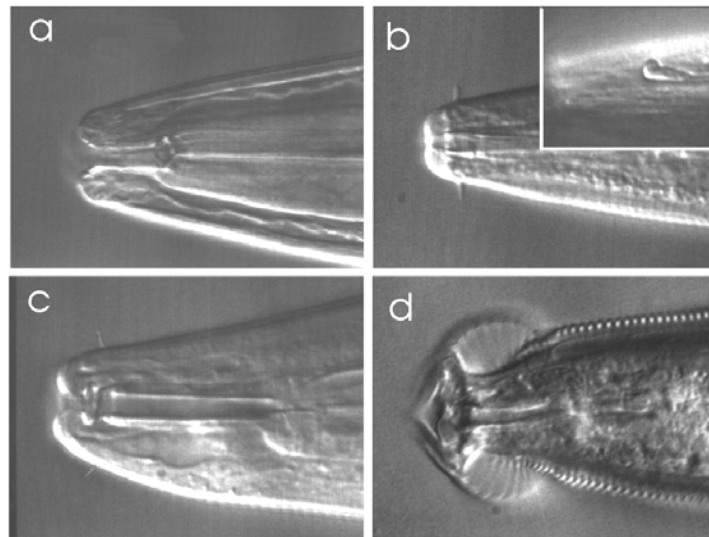


Abbildung 7.3: Morphologie der Kopfregion in vier verschiedenen Nematodenspezies, Lahl *et al.*, 2003. (a) *C. elegans*, (b) „*P. mekong*“. Insert: Oberfläche mit Amphid. (c) *Anaplectus* sp. (d) *T. auriculatus* mit Kopfkapsel und reusenähnlichen Kutikulastrukturen. Nomarski-optik.

Am intensivsten wurden *P. minimus* (Abbildung 5.16, Abbildung 7.31) und der bis jetzt noch nicht klassifizierte „*Plectus mekong*“ („*P. mekong*“) untersucht.

Mit einer Größe von 750-800 µm ist „*P. mekong*“ ein recht kleiner Vertreter der Plectiden. Er ist sehr beweglich und wirkt von seinem Habitus schlank.

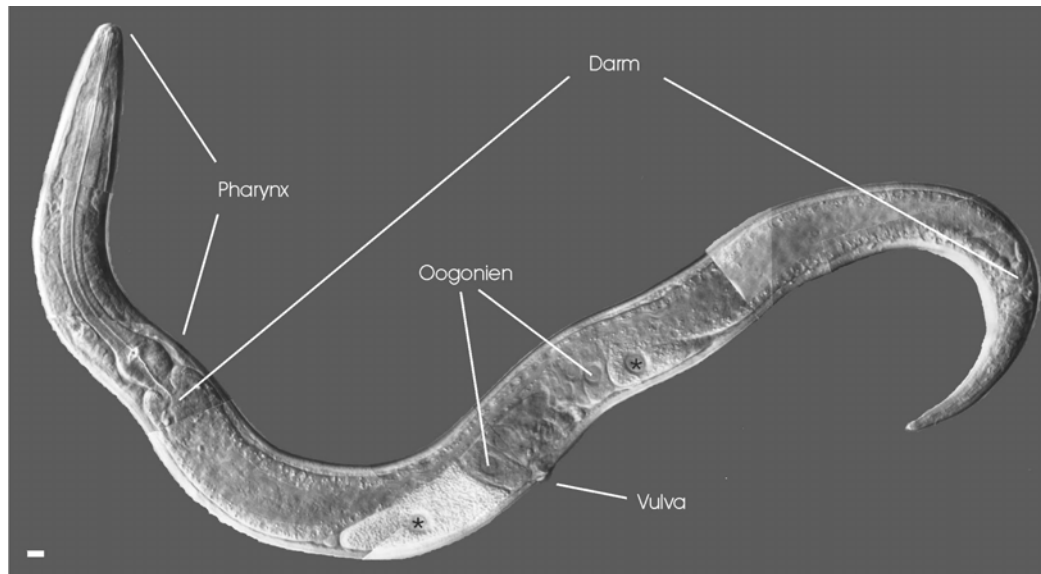


Abbildung 7.4: Adulter „*P. mekong*“. * reifstes Ei des anterioren/posterioren Gonadenarmes, weiter anterior bzw. posterior schlagen die Gonadenarme in die Tiefe um und verlaufen beide in Richtung Vulva. Oogonien: des anterioren/posterioren Gonadenarmes. Nomarski-optik. Eichstrich: 10 μ m

„*P. mekong*“ besitzt vier Kopfborsten, die relativ weit rostral an der Basis der Lippen inserieren. Das kurze, starre Mundrohr und ein breiter Pharynx mit einem Bulbus, der einen gefiederten Klappenapparat beinhaltet, sind weitere Kennzeichen (Abbildung 7.4).

Der Gonadenschlauch ist zweiarmig und trägt nur ein reifes Ei pro Arm. Der zeitliche Abstand in der Heranreifung zweier Eier aus je einem Arm des Gonadenschlauches ist allerdings so groß, dass meist nur das reifste Ei, das direkt vor der Vulva liegt, als solches auffällt. Das jeweils andere Ei ist noch wenig komprimiert, hat noch keine feste Schale und stellt sich daher recht kontrastarm dar.

Bei älteren Würmern kann man hin und wieder beobachten, dass Eier wahrscheinlich aufgrund einer Schwäche der Vulvamuskulatur nicht mehr abgelegt werden können und sich im Tier anhäufen. Alle untersuchten Plectiden haben mehrfach längere Generationsfolgen und produzieren erheblich weniger Nachkommen als *C. elegans*.

Die Eier sind ca. 47 μ m x 36 μ m groß und haben eine Schale in der Dicke vergleichbar mit der von *C. elegans*.

Im Unterschied zu allen anderen hier untersuchten Nematoden sind die Eier von Plectiden fast kugelförmig. Ab dem späten 1-Zellstadium befindet sich so viel Platz zwischen dem Embryo und der Schale, dass sich der Embryo um alle drei Raumachsen frei drehen kann. Diese Bewegungen können ein solches Ausmaß annehmen, dass die Lage des anterioren Poles relativ zur Eischale zeitweise um bis zu 90° variiert.

Eine bei allen Individuen reproduzierbare Drehung findet mit der Teilung der 4 AB-Zellen statt. Zu diesem Zeitpunkt rotieren alle Embryonen innerhalb ihrer Eischale von einer Lateralansicht um ihre Längsachse zu einer Ventralansicht. Höchstwahrscheinlich liegt die

Ursache in einer durch die Teilung bedingten Verschiebung des Schwerpunktes durch unterschiedliche Verteilung von Granula auf die Tochterzellen.

Plectiden sind bei einer Raumtemperatur von 22° C gut züchtbar. Höhere Temperaturen bis zu 32° C können toleriert werden und führen zu einer beschleunigten Embryonalentwicklung, die jedoch nicht so gravierend ausfällt wie bei *D. coronatus*.

Bei einer Zimmertemperatur von ca. 22° C dauert die Embryogenese von „P.mekong“ bis zum Schlupf der L₁ im Mittel 56,5 h (54-59 h) und ist damit mindestens viermal langsamer als bei *C.elegans*.

Durch fortlaufende Teilung der ersten Zelle P₀ entlang der anterior-posterior Achse und einer weiteren Teilung der somatischen Zelle EMS in MS und E gehen nach und nach die fünf somatischen Gründerzellen AB, MS, E, C, D und die Urkeimzelle P₄ hervor. Das Zellteilungsmuster der einzelnen Zelllinien ist konstant und invariabel. Nach Abschluss der Proliferationsphase folgen die von den anderen Nematoden bekannten Morphogenesestadien.

In Tabelle 3 werden die Teilungssequenzen von vier verschiedenen Plectiden bis zum 50-Zellstadium dargestellt.

„Plectus mekong“		<i>Plectus aquatilis</i>		<i>Plectus minimus</i>		<i>Tylocephalus auriculatus</i>	
ES 601		PDL 0018		PDL 0012		PDL 0030	
Zelle in Teilung	Zellstadium	Zelle in Teilung	Zellstadium	Zelle in Teilung	Zellstadium	Zelle in Teilung	Zellstadium
P ₀	2	P ₀	2	P ₀	2	P ₀	2
¹ AB ²	3	¹ AB ²	3	¹ AB ²	3	¹ AB ²	3
P ₁	4	P ₁	4	P ₁	4	P ₁	4
² AB ⁴	6	² AB ⁴	6	² AB ⁴	6	² AB ⁴	6
P ₂	7	P ₂	7	P ₂	7	P ₂	7
EMS	8	EMS	8	EMS	8	EMS	8
⁴ AB ⁸	12	⁴ AB ⁸	12	⁴ AB ⁸	12	⁴ AB ⁸	12
¹ C ²	13	¹ C ²	13	¹ C ²	13	¹ C ²	13
¹ MS ²	14	¹ MS ²	14	¹ MS ²	14	P ₃	14
⁸ AB ¹⁶	22	P ₃	15	P ₃	15	¹ MS ²	15
P ₃	23	⁸ AB ¹⁶	23	⁸ AB ¹⁶	23	¹ E ²	16
¹ E ²	24	¹ E ²	24	¹ E ²	24	⁸ AB ¹⁶	24
² MS ⁴	26	² MS ⁴	26	² MS ⁴	26	² C ⁴	26
¹⁶ AB ³²	42	² C ⁴	28	² C ⁴	28	² MS ⁴	28
² C ⁴	44	¹⁶ AB ³²	44	¹⁶ AB ³²	44	¹⁶ AB ³²	44
⁴ MS ⁸	48	² E ⁴	46	⁴ MS ⁸	48	² E ⁴	46
² E ⁴	50	⁴ MS ⁸	50	¹ D ²	49	⁴ MS ⁸	50

Tabelle 3: Zellteilungssequenzen von verschiedenen Plectiden, Lahl *et al.*, 2003. Grau unterlegte Felder markieren den Beginn der Gastrulation.

Vergleicht man die Plectiden untereinander, ist das Muster bis zum 13-Zellstadium identisch, erst danach treten einige geringe Abweichungen auf.

In Abbildung 7.5 werden einige ausgewählte Entwicklungsstadien der Entwicklung von „*P. mekong*“ dargestellt.

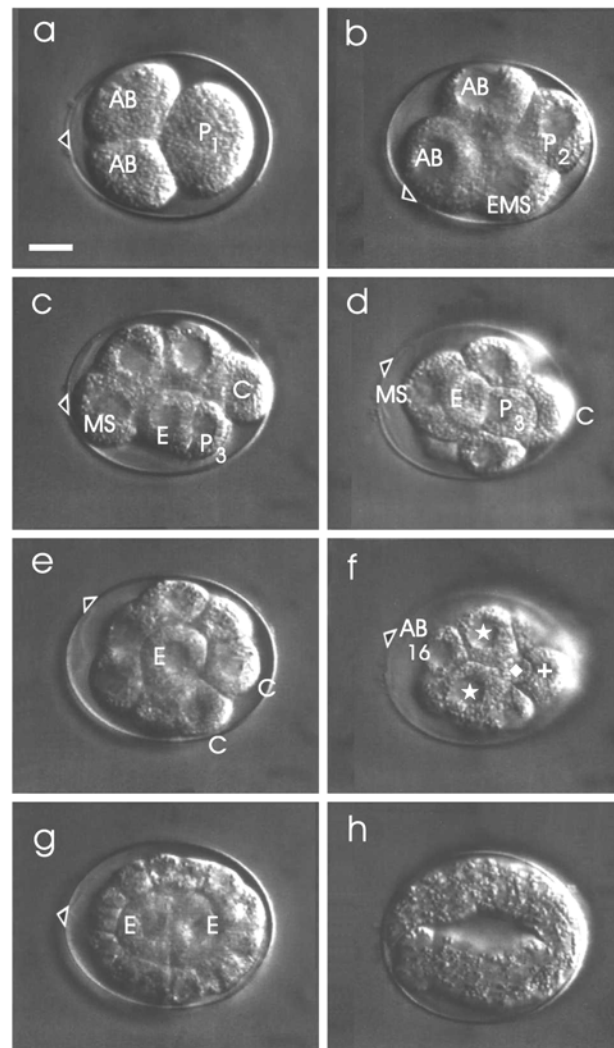


Abbildung 7.5: Embryogenesestadien von „*P. mekong*“, Lahl *et al.*, 2003. (a) 3-Zellstadium, (b) 4-Zellstadium, (c) 8-Zellstadium, 2 AB-Zellen außerhalb des Fokus, (d) 12-Zellstadium, Beginn der Einwanderung von E, (e) 14-Zellstadium, zentrale Fokusebene, E-Zelle ist eingewandert, (f) 24-Zellstadium, ventrale Fokusebene, P₄ teilweise eingewandert, (g) 24-Zellstadium, zentrale Fokusebene, (h) spätes Morphogenesestadium. AB16=eine von 16 AB-Zellen, * MS-Zellen, ♦ P₄, + D-Zelle, Orientierung anterior=links, anteriorer Pol= Δ , a-c linke Lateralansicht, d-g Ventralansicht. Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

Die Morphogenese beginnt ungefähr 29 h nach der Eiablage mit dem Bohnenstadium und verläuft wie bei den übrigen Nematoden über ein Komma-, Kaulquappen-, Pflaumen-, Brezel- und Schlingenstadium bis zum Schlupf der L₁.

Drei weitere Spezies, *P. acuminatus*, *Anaplectus* sp. und *E. arcticum* zeigen dieselben, oben genannten Charakteristika, wurden aber weniger detailliert untersucht.

7.1.4 *T. lirellus* – phylogenetischer Nachbar der Plectiden

Aufgrund der unklaren Positionierung (siehe Kapitel 5.2.4) wird die Entwicklung von *T. lirellus* hinsichtlich Gemeinsamkeiten und Unterschieden mit Plectiden untersucht (Kapitel 7.7.3).

Die in der Literaturübersicht beschriebenen morphologischen Gegebenheiten entsprechen den in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen, so dass hier nur die für die weitere Arbeit grundlegenden embryologischen Ergebnisse dargestellt werden.

Wie bei allen bisher beschriebenen Nematoden teilt sich im 1-Zellstadium die Zelle P_0 entlang der Längsachse des Embryos in die anterior gelegene somatische AB und die posteriore Keimbahnzelle P_1 . Mit den folgenden Teilungen der jeweiligen Keimbahnzelle und durch die Teilung der EMS in E und MS werden die somatischen Gründerzellen AB, MS, E, C, und D sowie die Urkeimzelle P_4 etabliert. Somit werden auch bei *T. lirellus* die gleichen Gründerzellen wie bei *C. elegans* etabliert.

Das Zellteilungsmuster ist konstant und invariant, so dass ein Zellstammbaum erstellt werden kann (Tabelle 4).

<i>Teratocephalus lirellus</i>	
Zelle in Teilung	Zellstadium
P_0	2
$^1AB^2$	3
P_1	4
P_2	5
$^2AB^4$	7
EMS	8
$^4AB^8$	12
P_3	13
$^1MS^2$	14
$^1C^2$	15
$^8AB^{16}$	23
$^1E^2$	24
$^2MS^4$	26
$^2C^4$	28
$^{16}AB^{32}$	44
$^4MS^8$	48
$^2E^4$	50

Tabelle 4: Zellteilungssequenzen bei *Teratocephalus lirellus*, Lahl *et al.*, 2003. Grau unterlegtes Feld markiert den Beginn der Gastrulation.

Die räumliche Anordnung der Blastomere ähnelt sehr der von *C. elegans*. Die Morphogenese phase setzt sich ebenfalls aus dem Koma-, Kaulquappen-, Pflaumen-, Brezel- und Schlingenstadium zusammen.

7.2 Fortpflanzungsmodus

7.2.1 Fortpflanzungsmodus bei *D. coronatus*

Bei Vereinzelung von Larvalstadien fand bei *D. coronatus* auf allen 10 angesetzten Agarplatten eine Vermehrung statt. Ein getrenntgeschlechtlicher Reproduktionsweg kann somit ausgeschlossen werden.

Bei der mikroskopischen Untersuchung des Gonadenschlauches auf Spermien konnten bei keinem Tier zu irgendeinem Zeitpunkt Spermien nachgewiesen werden, was eine parthenogenetische Fortpflanzungsweise nahelegt. Es fiel jedoch ein Abschnitt ähnlich einer Spermatheka in jedem Arm des Gonadenschlauches auf, der allerdings in keinem Fall Spermien beinhaltete (Abbildung 7.6).

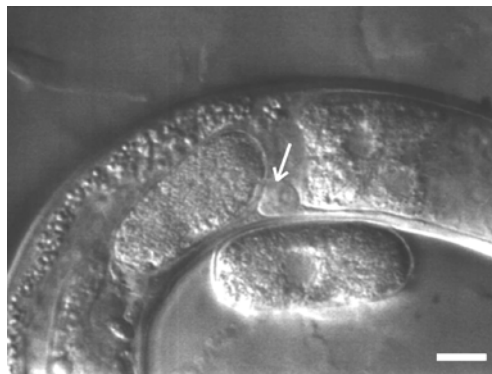


Abbildung 7.6: Ausschnitt aus dem Gonadenschlauch von *Diploscapter coronatus*. links reifes Ei, rechts Oocyten. Der Pfeil markiert die dazwischen liegende leere Spermatheka. Nomarski Optik. Eichstrich: 10µm

Da jedoch die Zahl der Nachkommen bei *D. coronatus* geringer ist als bei *C. elegans*, könnte die Zahl der Spermien ebenfalls sehr klein sein und so leichter übersehen werden können. Aus diesem Grund wurde die Untersuchung mit in Methanol/Aceton fixierten und anschließend mit DAPI gefärbten Tieren wiederholt.

Betrachtet man die so behandelten Tiere mit einem Fluoreszenzmikroskop, stellt sich der Gonadenschlauch unauffällig dar. Außer einer aufgelockerten Struktur und der konstanten Anzahl von sieben leuchtenden Punkten in dem zuvor auffälligen Bereich, die höchstwahrscheinlich die Kerne somatischer Zellen darstellen, gibt es keine Strukturen, die auf Spermien hinweisen (Abbildung 7.7).

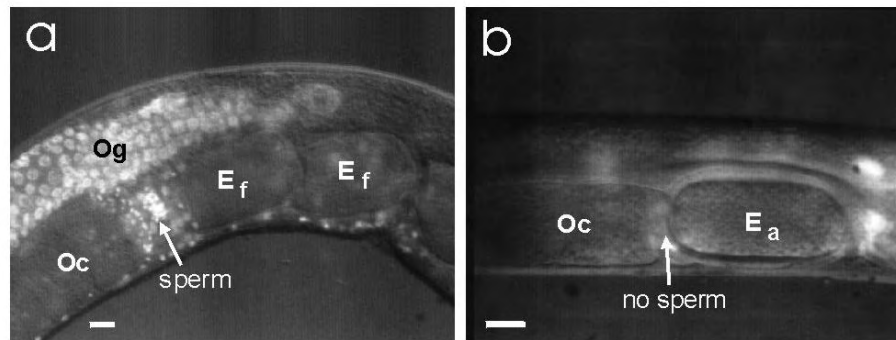


Abbildung 7.7: Ausschnitt aus dem Gonadenschlauch von *C. elegans* (a) und *D. coronatus* (b), Lahl *et al.*, 2006. Og Oogonien, Oc Oocyte, Ea aktiviertes Ei, Ef befruchtetes Ei. Der Pfeil deutet auf die Spermatheka. DAPI-Färbung mit unterlegter Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

Auch bei der Untersuchung der sehr frühen Embryogenese treten keine Hinweise auf die Bildung von Vorkernen oder deren Verschmelzung auf. Die Untersuchungen legen einen parthenogenetischen Fortpflanzungsweg für *D. coronatus* nahe (Lahl *et al.*, 2006).

7.2.2 Fortpflanzungsmodus bei Plectiden

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Plectiden fand nach Vereinzelung der Larvalstadien auf allen 10 Agarplatten eine Vermehrung statt. Somit kann eine getrenntgeschlechtliche Fortpflanzungsweise ausgeschlossen werden. Die Gonadenschläuche stellen sich bei der mikroskopischen Untersuchung ebenfalls unauffällig dar und liefern keinen Hinweis auf Spermien (Abbildung 7.4).

Aufgrund einer bei „P. mekong“ wie bei *D. coronatus* vorkommenden aufgeweiteten Struktur innerhalb des Gonadenschlauches erfolgt eine nähere Untersuchung aller Plectiden bei in Methanol/Aceton fixierten und anschließend DAPI gefärbten Tieren, wobei sich aber bei keiner Spezies Spermien nachweisen lassen.

Untersucht man die Eier von mit DAPI behandelten Tieren, fällt bei allen Eiern neben dem Oocytenkern ein leuchtender Punkt auf, bei dem es sich sowohl um einen männlichen Vorkern als auch um einen bereits ausgestoßenen Polkörper handeln könnte. Gegen den männlichen Vorkern spricht jedoch, dass dieser Punkt bereits zu einem Zeitpunkt vorhanden ist, an dem sich das Ei gerade erst in der Biegung des Gonadenschlauches befindet, also noch rostral einer möglichen Spermatheka, dem Ort der Befruchtung.

Zur Absicherung wurde eine Vielzahl von Tieren mit leicht unterschiedlich weit entwickelten Eiern im Elterntier untersucht.

Da durch Untersuchungen auf Polkörper (Kapitel 7.3.2) gezeigt werden konnte, dass „P. mekong“ immer zwei Polkörper abschnürt, und da Polkörper vor einer eventuellen Verschmelzung der beiden Vorkerne ausgestoßen worden sein müssen, käme bei einem Vorkommen eines männlichen Vorkerns bei jedem Ei der Zeitpunkt vor, in dem neben dem Oocytenkern drei leuchtende Punkte in Form von zwei Polkörpern und einem männlichen Vorkern zu sehen wären. In älteren Stadien dürften durch die anschließende

Vorkernverschmelzung neben dem Kern nur noch die beiden Polkörper als leuchtende Strukturen auszumachen sein.

In allen Fällen lassen sich jedoch neben dem Oocytenkern bei noch im Wurm befindlichen Eiern nur ein Punkt und bei abgelegten Eiern höchstens zwei Punkte ausmachen. Anschließend beginnt sich das Ei immer ohne Auftreten einer dritten leuchtenden Struktur zu teilen. Die beiden leuchtenden Punkte können auch bei mehrzelligen Embryonen noch ausgemacht und somit als Polkörper angesprochen werden.

Diese Ergebnisse sprechen für eine parthenogenetische Reproduktionsweise bei „*P. mekong*“. (Lahl *et al.*, 2003; Lahl *et al.*, 2006).

7.2.3 Zusammenfassung Fortpflanzungsmodus *D. coronatus* und Plectiden

Für die beiden Spezies, „*P. mekong*“ und *D. coronatus* ergaben sich keine Hinweise auf einen Reproduktionsweg, an dem Spermien beteiligt sind.

Getrenntgeschlechtliche Fortpflanzung konnte bei *D. coronatus* und den Plectiden durch Kultivierungsversuche ausgeschlossen werden.

Der aufgeweitete Abschnitt im Gonadenschlauch von *D. coronatus* und bei einigen Tieren von „*P. mekong*“ deutet zunächst auf eine Spermatheka hin, sämtliche weiterführenden Untersuchungen schließen jedoch eine hermaphroditische Reproduktion aus. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der angesprochene Abschnitt zu keiner Zeit Spermien enthält und somit nicht die Funktion einer Spermatheka erfüllt. Insgesamt legen alle Untersuchungen bei beiden Spezies einen parthenogenetischen Fortpflanzungsweg nahe.

Aus diesem Zusammenhang ergeben sich jedoch Fragen hinsichtlich der Erlangung eines diploiden Chromosomensatzes, der Methode der Eiaktivierung und der Ausbildung der Polarität bei parthenogenetischen Spezies, mit denen sich die folgenden Kapitel befassen.

7.3 Meiose und Polkörperbildung bei parthenogenetischen Spezies

Bei hermaphroditischen und getrenntgeschlechtlichen Arten wird das Spermium für die Erlangung des diploiden Chromosomensatzes der Zygote benötigt.

Bei einer parthenogenetischen Reproduktionsweise wie bei *D. coronatus* und „*P. mekong*“ fehlen jedoch die Spermien, so dass die Diploidie auf andere Weise erreicht werden muss. Einen Hinweis darauf geben die Anzahl und die Art und Weise der Entstehung der Polkörper.

7.3.1 Polkörperbildung bei *D. coronatus*

Um herauszufinden, wie viele Polkörper bei *D. coronatus* existieren, wurde eine Vielzahl von 1- bis 4-Zellstadien mit Methanol/Aceton fixiert und anschließend mit DAPI gefärbt.

Bei der Auswertung am Fluoreszenzmikroskop zeigte sich, dass fast alle 1-Zellstadien nur einen Polkörper abgeschnürt hatten. Die meisten 2-Zellstadien und bis auf einzelne Ausnahmen alle 4-Zellstadien besaßen jedoch zwei Polkörper. Höherzellige Embryonen

hatten immer zwei Polkörper. Alle Polkörper befanden sich innerhalb des Cytoplasmas, ausgestoßene Polkörper wie bei *C. elegans* kamen bei *D. coronatus* nicht vor.

Abbildung 7.8 zeigt die Situation bei *C. elegans* und *D. coronatus* nach einer DAPI-Färbung. Bei *C. elegans* haben sich schon im Vorkernstadium zwei Polkörper abgeschnürt (a). Bei *D. coronatus* kommen sowohl 2-Zellstadium mit einem Polkörper (b) als auch mit zwei Polkörpern (Insert) vor.

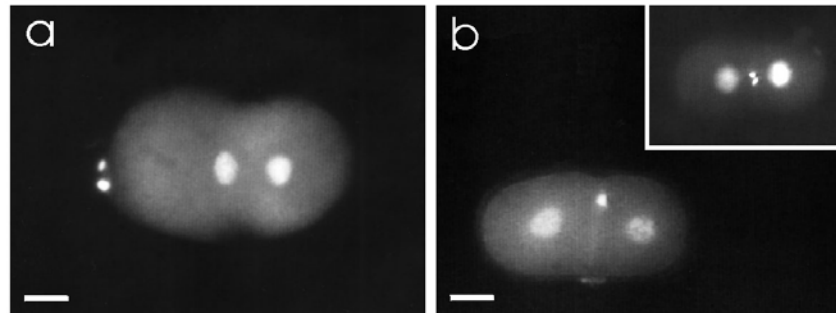


Abbildung 7.8: Polkörper bei *C. elegans* und *D. coronatus*. (a) Vorkernstadium bei *C. elegans* mit zwei Polkörpern, (b) 2-Zellstadium bei *D. coronatus* mit einem Polkörper, (Insert) 2-Zellstadium bei *D. coronatus* mit zwei Polkörpern. Anterior=links. DAPI-Färbung. Eichstrich: 10µm

Auffällig war die Position der Polkörper innerhalb des Cytoplasmas. Sie befanden sich in unmittelbarer Nähe zueinander und verblieben auch in höheren Zellstadien in direkter Nachbarschaft. Vor allem bei 2-Zellstadien war der Spalt zwischen den beiden Polkörpern manchmal so klein, dass sie leicht für nur einen Polkörper gehalten werden können.

Die beiden Polkörper befanden sich bei verschiedenen Embryonen desselben Zellstadiums immer an derselben Stelle. Anders als bei *C. elegans* (Abbildung 7.8 a) konnte kein signifikanter Größenunterschied zwischen den beiden Polkörpern festgestellt werden. Meist glichen sich die beiden Polkörper auch in ihrer Form.

Während der Passage des Eies durch den Gonadenschlauch tritt bei *D. coronatus* ein Zeitpunkt auf, an dem der Kern zwar lokalisierbar bleibt, jedoch für einige Minuten unscharf wird. Färbt man solche Tiere mit DAPI, lässt sich die Abschnürung des ersten Polkörpers als Auftreten eines leuchtenden Punktes neben dem ebenfalls leuchtenden Oocytenkern beobachten. In vivo nimmt der Polkörper eine sehr randständige Position ein, wird aber nicht aus dem Cytoplasma ausgestoßen. Das Ei liegt währenddessen fast vor der Vulva.

Die Meiose I erfolgt also bei *D. coronatus* noch vor dem Legen des Eies im Gonadenschlauch des Elterntieres.

Um die Herkunft des zweiten Polkörpers zu klären und Aufschlüsse über die reproduzierbare Position beider Polkörper zu einem bestimmten Zeitpunkt (Zellstadium) zu erhalten, wurden Embryonen direkt nach ihrer Ablage im 1-Zellstadium mikroskopisch über einige Teilungen hinweg beobachtet.

Mit der Teilung des Embryos in zwei Zellen beginnt der erste Polkörper von seiner randständigen Position aus in den Zwickel zwischen der entstehenden AB und P₁ zu

wandern und schiebt sich zunehmend zwischen die Membranen der beiden Zellen, bis er eine zentrale Position eingenommen hat. Bei stark gequetschten Embryonen kann man den Polkörper nun als Ringstruktur mit einem granulafreien Hof ausmachen. Im weiteren Verlauf vergrößert sich der granulafreie Bereich um den Polkörper, und er scheint ab diesem Zeitpunkt Nucleoli zu besitzen.

Kurz vor der anschließenden Teilung der AB-Zelle erfolgt in den meisten Fällen auch eine Teilung des Polkörpers, wobei die beiden daraus hervorgehenden Polkörper zukünftig immer in unmittelbarer Nähe zueinander bleiben. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich der Embryo im 2-Zellstadium.

Während der folgenden Teilung der P₁ scheint es, als nehme der Kern oder das zugewandte Centrosom räumlichen Kontakt zu der Polkörperformation auf, indem der Kern der P₁ seine zentrale Position innerhalb der Zelle verlässt, sich auf die beiden Polkörper zu bewegt und in direkter Nachbarschaft zu liegen kommt.

In 4-zelligen Embryonen (Abbildung 7.9) befinden sich die beiden Polkörper entweder in direkter Nähe zum Kern von ABp (a) oder EMS (b).

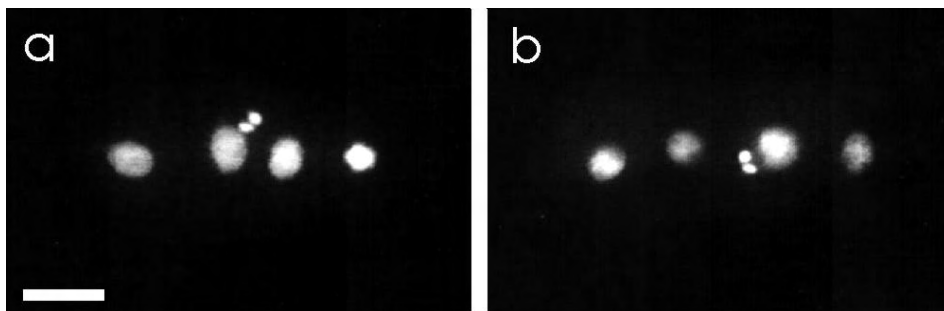


Abbildung 7.9: Polkörper in 4-Zellstadien von *D. coronatus*. (a) beide Polkörper in ABp, (b) beide Polkörper in EMS. Anterior=links. DAPI-Färbung. Eichstrich: 10µm

D. coronatus besitzt ebenso wie *C. elegans* zwei Polkörper. Während bei *C. elegans* beide Polkörper jedoch im Zuge von zwei aufeinander folgenden Meiosen sukzessive vom Oocytenkern abgeschnürt werden, stammt bei *D. coronatus* nur der erste Polkörper direkt vom Kern. Der zweite Polkörper entsteht durch Teilung des ersten.

Für den Ploidiegrad des verbleibenden Oocytenkernes ergeben sich hieraus Unterschiede zwischen *D. coronatus* und *C. elegans*.

7.3.2 Polkörperbildung bei „*P. mekong*“

Da bei „*P. mekong*“ wie bei *D. coronatus* Polkörper nicht aus dem Cytoplasma ausgeschleust werden, wurden Embryonen verschiedener Zellstadien und eiertragende Adulte mit Methanol/Aceton fixiert und anschließend mit DAPI gefärbt.

Bei allen vom Elterntier gelegten Embryonen konnten neben den gefärbten Zellkernen stets zwei Polkörper gefunden werden. Immer lag ein Polkörper in direkter Nähe zu einem Zellkern und der andere etwas weiter entfernt im Cytoplasma. Im Folgenden wird darum in einen kernnahen und einen kernfernen Polkörper unterschieden (Abbildung 7.10b).

Beide Polkörper befanden sich mit Ausnahme während ihrer Abschnürung im Cytoplasma und wurden nicht dauerhaft ausgestoßen.

Soweit beurteilbar, glichen sich die Polkörper weder in Form noch Größe. Bei manchen Präparaten schien ein Polkörper etwas größer zu sein und stärker zu leuchten als der andere. Dies konnte allerdings nicht übereinstimmend für alle Embryonen festgestellt werden (Lahl *et al.*, 2003).

Bei der Untersuchung der DAPI gefärbten, eiertragenden Adulten erkennt man den ersten Polkörper jeweils neben dem Oocytenkern als leuchtenden Punkt. Die Meiose I findet also noch innerhalb des Elterntieres statt. Abbildung 7.10 a zeigt ein solches aus dem Elterntier herausgeschnittenes und mit DAPI gefärbtes Ei.

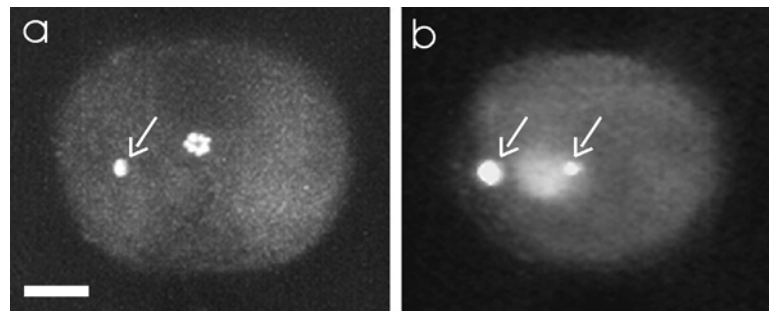


Abbildung 7.10: Polkörperbildung bei „Plectus mekong“. (a) 1. Polkörper liegt im Cytoplasma, Kern in früher Metaphase der Meiose II, (b) zwei Polkörper, ein kernnaher (rechts) und ein kernferner (links) liegen im Cytoplasma. Pfeil=Polkörper. DAPI-Färbung mit unterlegter Nomarskioptik. Eichstrich: 10µm

Um die Herkunft des zweiten Polkörper zu klären, wurden Objektträger mit Agaraufgabe angefertigt und eiertragende Adulte darauf zur längeren Beobachtung unter dem Mikroskop verbracht. Auf diese Weise gelangt man an möglichst frühe, gelegte 1-Zellstadien. Abbildung 7.11 zeigt die Entstehung des zweiten Polkörper.

Nach der Eiablage, der erste Polkörper ist bereits im Elterntier abgeschnürt worden, fallen zunächst mehrere granulafreie Bereiche im Cytoplasma auf. Zu dieser Zeit füllt der Embryo noch den gesamten Schaleninnenraum aus. Durch Cytoplasma-Umverteilungen wird der Kern zunächst an den seitlichen Rand des Eies, dann an einen Pol verlagert. Er legt sich dem Pol flächig an, ist aber noch als solcher zu erkennen (Abbildung 7.11 a). Zur gleichen Zeit nehmen die Cytoplasmaströmungen ab.

Im Folgenden verliert der Kern seine Kontur (b) und der zweite Polkörper wird nach und nach in den Perivitellinraum geschoben (b-d). In allen beobachteten Fällen bleibt es jedoch nicht bei dieser Lage, sondern der Polkörper wird später wieder in das Cytoplasma aufgenommen. Sobald der zweite Polkörper ausgestoßen ist, wird der Kern wieder als solcher erkennbar (e) und gibt seine polare Position auf. Er nimmt deutlich an Größe zu (f).

In der Mitte des Embryos angelangt, setzen heftige Cytoplasma-Umverteilungen ein, die den gesamten Embryo erfassen und zu dramatischen Verformungen mit Ausbuchtungen der Zellmembran führen.

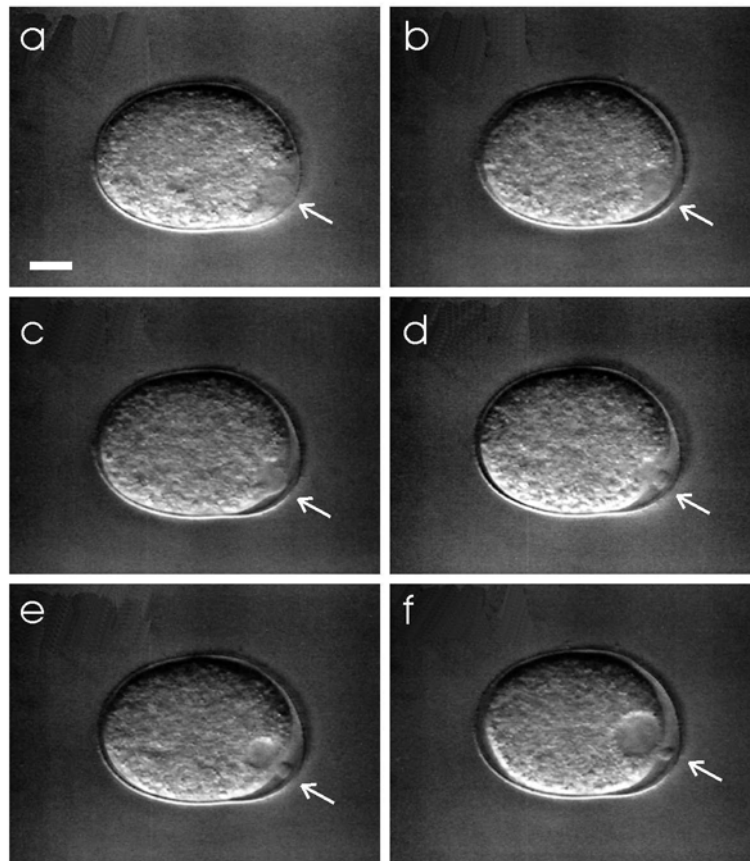


Abbildung 7.11: Bildung des zweiten Polkörpers bei „P. mekong“ mit vorübergehender Ausstoßung (Pfeil). (a) randständige Position des Kernes, Kern noch als solcher erkennbar, (b) + (d) Verlust der Kernstruktur, Rückzug des Cytoplasmas und vorübergehende Ausschleusung des zweiten Polkörpers, (e) Konturen des Kernes wieder erkennbar, zweiter Polkörper im Perivitellinraum, (f) Kern hat deutlich an Größe zugenommen. Nomarskiopik. Eichstrich: 10µm

Mit der Polkörperabschnürung gehen starke Membrankontraktionen einher, so dass der Embryo nach Abgabe kleiner und kugelförmig ist und so längst nicht mehr den gesamten Schaleninnenraum ausfüllt. Anschließend beginnt der Embryo, heftig um alle drei Raumachsen zu rotieren. Kurz vor der Teilung von P_0 kommen diese Bewegungen zum Stillstand.

7.3.3 Zusammenfassung Reduktionsteilung und Polkörperbildung bei parthenogenetischen Spezies

Vergleicht man die Polkörperabschnürung von „P. mekong“ mit der von *D. coronatus*, fällt ein gravierender Unterschied auf. Obwohl bei beiden parthenogenetischen Spezies jeweils zwei Polkörper existieren, ist doch die Entstehungsweise eine andere.

Während bei *D. coronatus* nur der erste Polkörper direkt vom Kern abgeschnürt wird und der zweite Polkörper durch Teilung aus dem ersten entsteht, stammen bei „P. mekong“ beide Polkörper vom Kern, werden also sukzessive wie bei *C. elegans* abgeschnürt und gehen so

jeweils mit Verlust von genetischer Information einher. Bei *C. elegans* dient das Spermium der Aufregulierung des durch die Polkörperabgabe haploiden Chromosomensatzes. Bei dem parthenogenetischen „*P. mekong*“ hingegen besteht diese Möglichkeit jedoch nicht. Er muss dem Problem der Erlangung der Diploidie auf andere Weise begegnen. Da bei *D. coronatus* nur eine Meiose abläuft und der Kern so diploid ($2n$) bleibt, stellt sich dieses Problem bei dieser Spezies nicht.

7.4 Eiaktivierung bei *D. coronatus* und „*P. mekong*“

Bei sich parthenogenetisch fortpflanzenden Spezies wie *D. coronatus* und den in dieser Arbeit untersuchten Plectiden stellt sich die Frage nach dem Mechanismus der Aktivierung des bis dato metabolisch inaktiven Eies. Da bei *D. coronatus* und bei Plectiden keine Spermien vorhanden sind, die wie bei *C. elegans* während der Befruchtung auch eine Aktivierung einleiten, muss dieses Problem auf andere Weise gelöst werden.

Bei *A. nanus* wurden der Wiedereintritt eines zuvor ausgestoßenen Polkörpers und die anschließende Fusion mit dem Zellkern sowie die mechanische Verformung der Oocyte bei der Passage durch die Biegung des Gonadenschlauches als Auslöser für eine Aktivierung diskutiert (Kutzowitz, 1993; Sadler, 2000) (Abbildung 7.12).

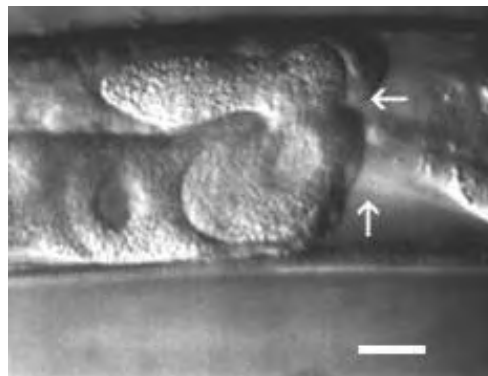


Abbildung 7.12: Verformung der Oocyte bei der Passage des Gonadenschlauches bei *A. nanus*, Lahl *et al.*, 2006. Die Pfeile zeigen die Bewegungsrichtung an.
Nomarskioptik. Eichstrich: 10µm

Bei *D. coronatus* und „*P. mekong*“ ist nichts über die Art und Weise der Eiaktivierung bekannt, so dass zunächst nach Möglichkeiten einer mechanischen Verformung der Oocyte gesucht wurde. Das reife Ei wurde dabei jeweils während der Passage durch die Biegung des Gonadenschlauches beobachtet. Anders als bei *A. nanus* konnten jedoch bei beiden Spezies keine Engpässe im Gonadenschlauch festgestellt werden, bei denen sich eine Verformung des Eies und des Zellkernes ergeben könnte.

Insbesondere bei *D. coronatus* ist ein starkes Zusammendrücken der Oocyte wie bei *A. nanus* nicht möglich. Bei *A. nanus* ist die Oocyte schon vor Passage der Biegung in ihrer Reifung sehr weit fortgeschritten, hat an Größe gewonnen und schon relativ viel Granula eingelagert. Erst dadurch kann die Umschlagsstelle des Gonadenschlauches als verformende Engstelle fungieren (Abbildung 7.12).

Bei *D. coronatus* hingegen erfolgt die Einlagerung der Granula und die damit verbundene Größenzunahme der Oocyte erst nach der Biegung des Gonadenschlauches. Zum Zeitpunkt der Passage durch die Umschlagstelle sind die Eier noch zu klein (Abbildung 7.13) (Lahl *et al.*, 2006).

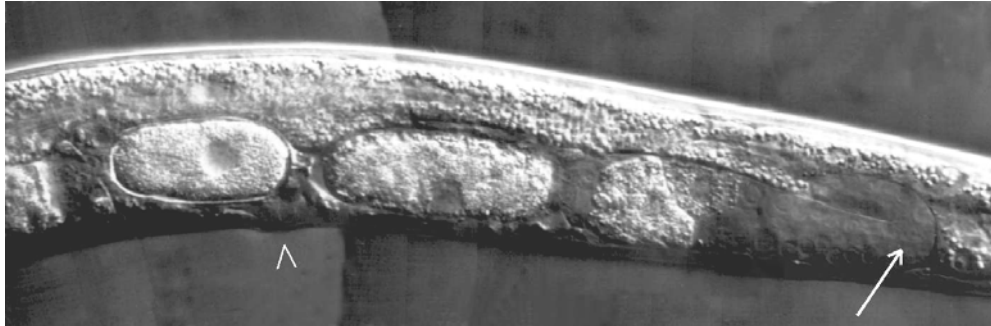


Abbildung 7.13: Gonadenarm bei *D. coronatus*. Keine Engstelle, Dottereinlagerung erfolgt erst posterior der Biegung. Pfeil=U-förmig gebogener Gonadenschlauch, Pfeilkopf=Vulva. Anterior=links. Nomarskiptik.

Auffällig war jedoch, dass sowohl bei *D. coronatus* als auch bei „*P. mekong*“ (Abbildung 7.14) der Legevorgang mit einer starken Verformung einhergeht. Da der Durchtritt durch die Vulva ebenfalls eine mechanische Beanspruchung des Eies bedeutet, liegt der Verdacht nahe, dass die Aktivierung durch den Legevorgang oder zumindest während des Legevorganges erfolgt.

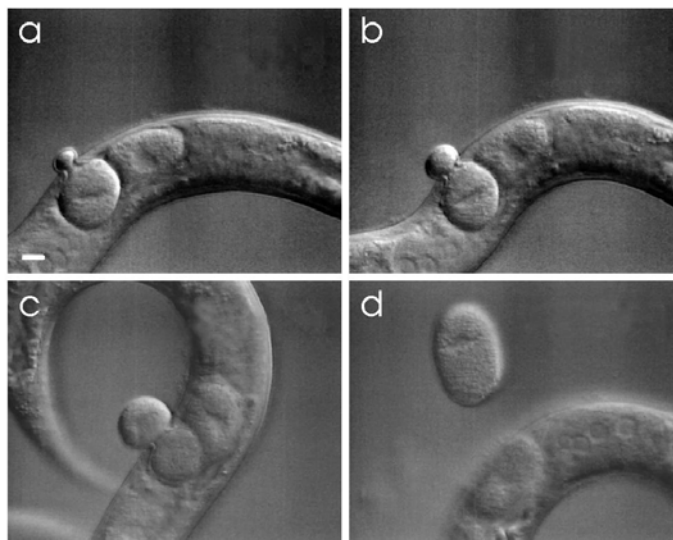


Abbildung 7.14: Eiablage bei „*Plectus mekong*“. Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

Um diese Annahme zu prüfen, wurden eiertragende Tiere beider Spezies einer Behandlung mit PPX zur Lähmung der Vulvamuskulatur unterzogen. Auf diese Weise wurde die Eiablage unterbunden und eine eventuell für die Entwicklung nötige Quetschung bei der Passage durch die Vulva verhindert. Würde die Verformung bei der Eiablage den aktivierenden Faktor darstellen, könnten sich derartige Eier im Elterntier nicht weiterentwickeln.

Hinsichtlich dieses Experiments verhalten sich beide Spezies unterschiedlich.

Bei *D. coronatus* findet trotz ausbleibender Quetschung eine Entwicklung der Eier im Organismus des Elterntieres statt (Abbildung 7.16), die in Einzelfällen bis zur Entstehung einer Larve führt. Somit kann eine Aktivierung der Eier über den Legevorgang für diese Spezies ausgeschlossen werden.

Bei „*P. mekong*“ hingegen setzte bei keinem der im Elterntier verbliebenen Eier eine Furchung ein. Alle Embryonen arretierten im 1-Zellstadium. Obwohl sich bei dieser Spezies normalerweise höchstens zwei reife Eier im Gonadenschlauch befinden, schritt trotz ausbleibender Eiablage die Eiproduktion weiter fort (Abbildung 7.15 a), so dass sich nach 24-stündigem Aufenthalt in PPX-haltigem Medium schließlich bis zu sieben Eier im Gonadenschlauch befanden und der Gonadenschlauch zu beiden Seiten bis zur Biegung mit Eiern angefüllt war.

Drei solcher Würmer mit insgesamt 15 Eiern wurden zerschnitten und mit DAPI behandelt. Sowohl die älteren, also die der Vulva am nächsten gelegenen Embryonen, als auch die jüngeren Eier in der Nähe der Biegung des Gonadenschlauches befanden sich im selben Stadium: der erste Polkörper war bereits abgeschnürt, während der Zellkern sich in der Anaphase der Meiose II befand und als leuchtende Struktur, bestehend aus zwei Strichen, darstellte (Abbildung 7.15 b). Anders als bei *C. elegans*, bei dem die Eier in der Prophase der Meiose I arretieren, findet bei „*P. mekong*“ ein Arrest in der Anaphase der Meiose II statt.

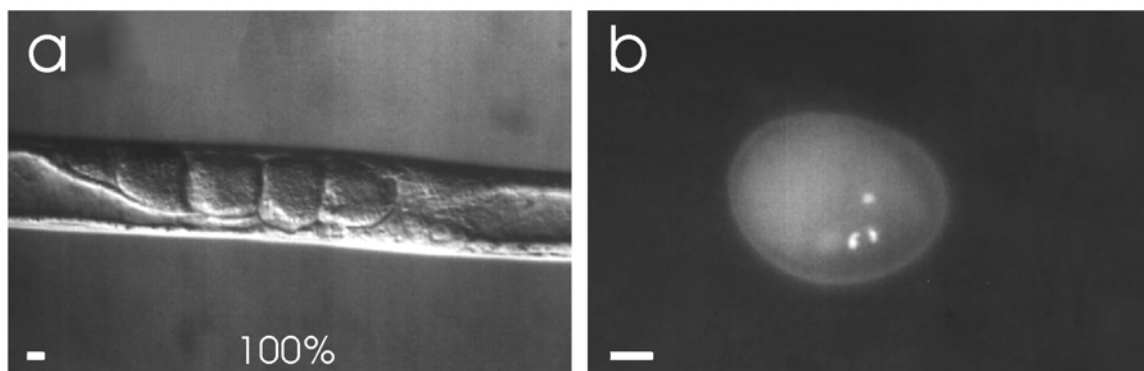


Abbildung 7.15: Zustand nach Narkotisierung von „*Plectus mekong*“ mit PPX. (a) Anreicherung von Eiern im Gonadenschlauch, Nomarski-Optik, (b) herausgeschnittenes Ei aus a, Arrest in Anaphase der Meiose II, DAPI-Färbung. Eichstrich: 10µm

Der Verbleib der Eier von „*P. mekong*“ im Elterntier verhindert also hier eine Weiterentwicklung. Um zu prüfen, ob der fehlende Legevorgang oder das Milieu im Elterntier Ursache für den Arrest sein könnten, wurden mit PPX behandelte Tiere, die Eier angehäuft hatten, so mit einem Skalpell aufgeschnitten, dass auf keinen Fall eine Quetschung der Eier stattfinden konnte, und die Eier in das PPX-haltige Medium entlassen.

Bei 9 von 23 derart behandelten Eiern setzte eine Furchung ein, die mindestens bis zum 2E-Zellstadium und maximal bis zur fertigen Larve voranschritt. Es handelte sich jedoch immer um Embryonen, die unmittelbar neben der Vulva oder an zweiter Stelle direkt neben dem reifsten Ei gelegen hatten. Die übrigen Eier zerflossen bald nach ihrer Freisetzung. Da es

sich bei ihnen um relativ weit von der Vulva entfernt gelegene, also recht junge Eier, handelte, war wahrscheinlich die Schalenbildung nicht abgeschlossen.

Auf diese Weise konnte auch ein keimsschädigender Einfluß des PPX-Mediums ausgeschlossen werden.

Auch bei alten, unbehandelten Tieren von „*P. mekong*“, die aufgrund einer Schwäche der Vulvamuskulatur eine Legehemmung aufwiesen und so mehrere Eier im Gonadenschlauch anhäuften, arretierten alle Embryonen in der Anaphase der Meiose II wie die von mit PPX behandelten Tieren. Nach deren Freisetzung ins Außenmedium setzte auch bei ihnen die Furchung ein (Lahl *et al.*, 2003 und 2006).

Es tritt bei gelegten Eiern von „*P. mekong*“ jedoch immer mal wieder eine wechselnd große Anzahl von Embryonen auf, manchmal sogar die Mehrzahl, die den Arrest in der Meiose II nicht überwinden können. Sie bleiben als 1-Zellstadien auf der Agarplatte liegen. Der Meioseblock scheint demnach bei „*P. mekong*“ manchmal nicht aufgehoben werden zu können (Lahl *et al.*, 2006).

7.4.1 Zusammenfassung Eiaktivierung bei *D. coronatus* und „*P. mekong*“

Insgesamt lässt sich der aktivierende Faktor bei beiden Spezies nicht eindeutig feststellen. Einige Aspekte konnten jedoch geklärt werden:

Bei *D. coronatus* muss die Aktivierung der Eier im Elterntier erfolgen, da bei Verbleib der Eier im Elterntier unter experimentellen Bedingungen eine Furchung einsetzt. Äußere Faktoren und eine Aktivierung über die Verformung während des Legevorganges können somit ausgeschlossen werden. Auch kann davon ausgegangen werden, dass bei dieser Spezies keine Aktivierung durch eine mechanische Quetschung bei der Passage des Gonadenschlauches, wie sie bei *A. nanus* beobachtet wurde, erfolgt. Ein solch enger, verformender Abschnitt konnte bei *D. coronatus* nicht gefunden werden.

Ebenso ist eine Aktivierung durch Wiederaufnahme eines ausgestoßenen Polkörpers, wie sie Mittwoch (1978) darstellt, nicht möglich.

Auch bei „*P. mekong*“ konnte eine Aktivierung durch Wiederaufnahme eines ausgestoßenen Polkörpers ausgeschlossen werden (Kapitel 7.3). Bei dieser Spezies erfolgt die Aktivierung höchstwahrscheinlich außerhalb des Elterntieres. Bei Verbleib im Gonadenschlauch kurz vor der Vulva arretieren die Eier in der Anaphase der Meiose II.

Eine Aktivierung über die Verformung während des Legevorganges kann aufgrund der Weiterentwicklung nach Verhindern der Quetschung durch Eröffnung der Gonade nicht stattfinden. Somit scheinen Einflüsse der Außenwelt für eine Eiaktivierung bei „*P. mekong*“ am wahrscheinlichsten.

7.5 Etablierung der Raumachsen bei Nematodenembryonen

Die Bezeichnung und der Verlauf der Raumachsen sind im Glossar dargestellt.

7.5.1 Ausbildung der anterior-posterior Achse

Bei der hermaphroditischen Spezies „Herma-1“ (PS 1146) sowie bei den parthenogenetischen Spezies *D. coronatus*, *A. nanus* und „P. mekong“ wird bereits mit der ersten Teilung in anterior-posteriorer Richtung eine deutliche Polarität innerhalb des Embryos sichtbar. Am anterioren Pol entsteht die erste Somazelle AB, am posterioren Pol die Keimbahnzelle P₁.

Parthenogenetischen Spezies fehlt der polaritätsvermittelnde Faktor in Form der Spermien. Es stellt sich die Frage, wann sich bei diesen Spezies eine sichtbare Polarität einstellt, wie sie vermittelt wird und ob sie gerichtet ist.

Da die erste Teilung bei den hier untersuchten Spezies erst nach der Eiablage erfolgt, kann die Position der Vulva nicht als Richtungsindikator relativ zu einem bestimmten Pol des Eies herangezogen werden. So ist unter physiologischen Bedingungen zunächst unklar, ob die Richtung der Polarität abhängig ist von der Lage der Embryonen im Elterntier bzw. ob es bei den einzelnen Spezies eine vorherrschende Richtung wie bei *C. elegans* gibt.

Um die Eiablage zu verhindern und so die Ausrichtung der Embryonen im Elterntier relativ zur Vulva bestimmen zu können, wird durch Zugabe des Narkosemittels PPX die Vulvamuskulatur gelähmt. Durch Kontrollversuche wurde zunächst sichergestellt, dass PPX die Ausbildung der Polarität nicht beeinflusst und die Lähmung reversibel ist.

Das bei *C. elegans* bekannte Verhältnis von 98% Embryonen, die mit dem posterioren Pol zur Vulva zeigen, wurde mit unbehandelten Würmern und mit PPX behandelten Würmern überprüft. Es ergaben sich keine Abweichungen.

Von jeder Spezies wurde eine gut bewachsene Platte mit eiertragenden, adulten Tieren abgewaschen. Die Tiere wurden für ungefähr 24 h in eine PPX-Lösung verbracht, um anschließend Präparate anzufertigen. Von jeder Spezies wurden ca. 100 Embryonen zwischen dem 2- und 6-Zellstadium hinsichtlich ihrer Orientierung zur Vulva ausgezählt.

Da bei *D. coronatus* der Größenunterschied zwischen der AB und der P₁ recht klein ist und auch im 4-Zellstadium eine Unterscheidung zwischen ABa und P₂ unter Umständen etwas schwer fallen kann, wurde diese Spezies erst im 5-Zellstadium ausgewertet.

Abbildung 7.16 zeigt jeweils den Bereich des Gonadenschlauches mit dem reifsten Ei und der Vulva als Positionsmarker. Die Prozentangabe gibt an, wie oft der im Bild dargestellte Fall bei der jeweiligen Spezies auftritt. Die Orientierung der restlichen an 100% fehlenden Fälle ist entgegengesetzt. Für *D. coronatus* und „Herma-1“ (PS 1146) werden Abbildungen beider Zustände gezeigt.

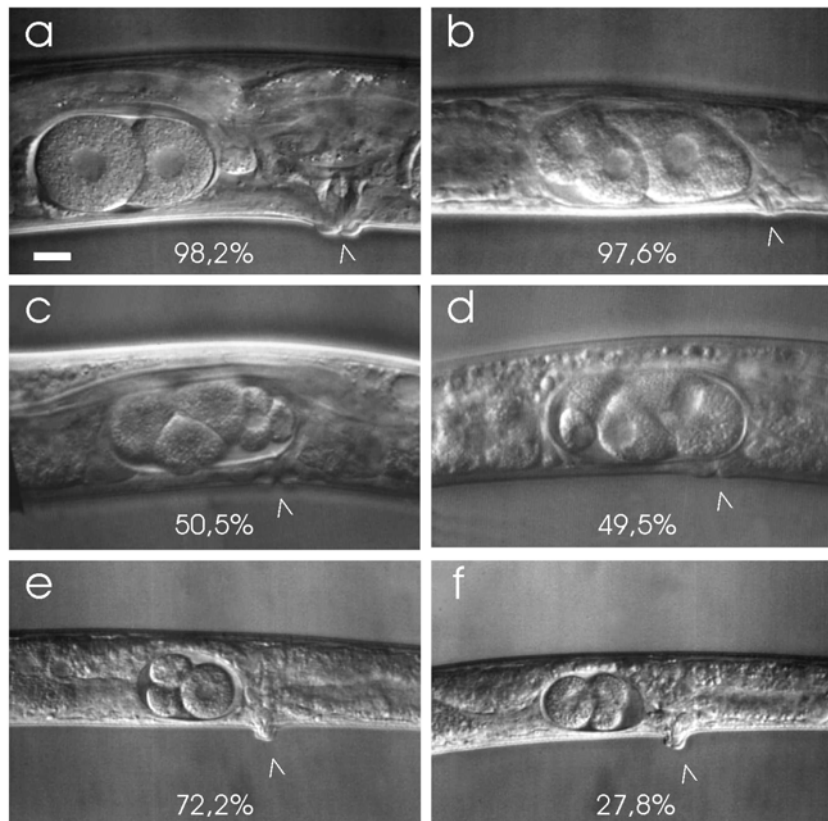


Abbildung 7.16: Ausrichtung der Polarität der Eier bei PPX-narkotisierten Tieren, teilweise in Lahl *et al.*, 2006. (a) *C. elegans*, (b) *A. nanus*, (c) + (d) *D. coronatus*, (e) + (f) „Herma-1“ (PS 1146). Die Prozentangabe beschreibt die Häufigkeit des vorliegenden Falles. Pfeilkopf=Vulva. Anterior=links. Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

Bei *C. elegans* ist in 98% aller Fälle die Keimbahnzelle P_1 zur Vulva gerichtet (Abbildung 7.16 a). Eine ähnlich hohe Prozentangabe (97,6%) ergibt sich bei den Untersuchungen an *A. nanus* (Abbildung 7.16 b). Hier ist die Polarität jedoch der von *C. elegans* entgegengesetzt, so dass die große AB-Zelle vulvawärts gerichtet ist.

Erstaunliche Ergebnisse fanden sich bei *D. coronatus* (Abbildung 7.16 c+d). Bei dieser Spezies überwiegt keine der beiden möglichen Ausprägungen. Zu fast gleichen Teilen liegt die Keimbahn P_1 bzw. die AB-Zelle der Vulva am nächsten (50,5% zu 49,5%).

Bei „Herma-1“ (PS 1146) ist wie bei *A. nanus* die AB-Zelle häufiger vulvawärts gerichtet (72,2%), wenn auch nicht in so starkem Maße (Abbildung 7.16 e+f).

Da „P. mekong“ sich nicht im Elterntier weiterentwickelt, sondern alle Embryonen einen Arrest einlegen, solange sie sich im Elterntier befinden, können bei dieser Spezies keine Aussagen zur Richtung der Polarität relativ zur Vulva gemacht werden. Der Arrest tritt anders als bei *C. elegans* in der Anaphase der Meiose II auf. (Abbildung 7.15). Es ist dabei egal, ob die Tiere betäubt wurden oder unbehandelt sind. Die Embryonen nehmen ihre Entwicklung wieder auf sobald sie in die Außenwelt entlassen werden.

Auch bei gelegten und sich dann furchenden Eiern von „*P. mekong*“ ist es nicht möglich, die sich ausbildende Polarität in Bezug zu einer vormaligen Orientierung des Eies im Gonadenschlauch zu setzen. Gründe dafür sind Deformierungen während des Legens, heftige cytoplasmatische Strömungen vor der ersten Teilung und sich verändernde Orientierung des Embryos und damit der anterior-posterior Achse relativ zur Eischale.

Tabelle 5 fasst die Anzahl der untersuchten Embryonen jeder Spezies und deren Ausrichtung hinsichtlich der Vulva als Bezugspunkt zusammen.

Species	n	AB proximal	P ₁ proximal
<i>C. elegans</i>	101	2,0%	98,0%
<i>A. nanus</i>	95	97,6%	2,4%
„Herma-1“	108	72,2%	27,8%
<i>D. coronatus</i>	107	49,5%	50,5%
„ <i>P. mekong</i> “	ca. 200	keine Teilung im Wurm	

Tabelle 5: Ausrichtung der Polarität der Eier bei mit PPX narkotisierten Tieren

Bei allen Spezies außer *D. coronatus*, die eine Polarität im Elterntier zeigen, herrscht eine vorwiegende Richtung der Polarität vor.

Während bei *A. nanus* die Polarität stark in eine Richtung ausgeprägt ist, sind bei *D. coronatus* die beiden möglichen Richtungen, die die Polarität annehmen kann, so gut wie ausgewogen. *A. nanus* und *D. coronatus*, beide parthenogenetische Spezies, zeigen damit ein unterschiedliches Verhalten. Die Richtung der Polarität kann demnach nicht von der Fortpflanzungsweise allein abhängig sein kann. Die Kompensation des Verlust der Spermien mit seiner Funktion der Polaritätsvermittlung scheint unter parthenogenetischen Arten auf verschiedene Weisen erfolgt zu sein (Lahl *et al.*, 2003 und 2006).

Auch „Herma-1“ und *C. elegans* als hermaphroditische Spezies zeigen eine voneinander unterschiedliche Hauptrichtung der Polarität.

7.5.2 Ausbildung der dorso-ventralen Achse

7.5.2.1 Das rhomboide 4-Zellstadium bei Cephalobiden, Plectiden und *C. elegans*

Nachdem mit der Teilung der P₀ in die anteriore, somatische AB-Zelle und die posterior gelegene Keimbahnzelle P₁ die anterior-posterior-Achse festgelegt wurde, erfolgt nun mit der Teilung dieser beiden Zellen die Etablierung der dorso-ventralen Achse.

Abbildung 7.17 zeigt eine schematische Darstellung der Entstehung des 4-Zellstadiums. Der Vorgang selbst wird in Abbildung 7.18 am Beispiel von *Rhabditis* sp. (ES 104; laborintern: Thrinax) dargestellt. Bei dieser Spezies sind die Teilungsspindeln im Vergleich zu *C. elegans* zu diesem Zeitpunkt schon voll ausgebildet, so dass der Vorgang besser beobachtbar ist. *C. elegans* und Plectiden folgen jedoch demselben Prinzip.

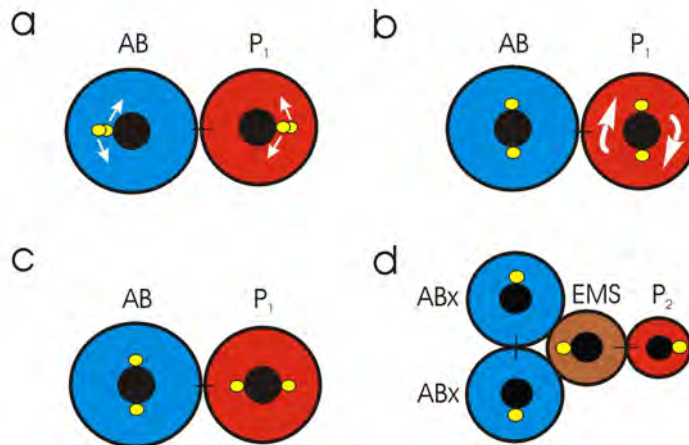


Abbildung 7.17: Schematische Darstellung der Centriolen während der Teilung von 2 nach 4 Zellen bei Cephalobiden, Plectiden und *C. elegans*. Schwarze Striche=Schwesterzellen, gelbe Kreise=Centriolen, weiße gerade Pfeile=Wanderung der Centriolen, gebogene weiße Pfeile= Rotation des Centrosomen-Kern-Komplexes.

Jede Tochterzelle der P_0 hat bei deren Teilung ein Centriol geerbt, das jeweils dem Kern der AB- und der P_1 -Zelle anhaftet. Nach Verdoppelung beginnen die Centriolenpaare beider Zellen entlang der Zellkerne auseinander zu wandern (Abbildung 7.17 a) bis sich die Centriolen schließlich jeweils in transverser Position zueinander befinden (Abbildung 7.17 b, Abbildung 7.18 b).

Während in AB die Position der Centriolen zueinander transvers bleibt (Abbildung 7.17 c, Abbildung 7.18 c+d), rotiert in P_1 der gesamte Centrosomen-Kern-Komplex nach Erreichen der transversen Stellung der Centriolen (Abbildung 7.17b, Abbildung 7.18 c). Diese Rotation um 90° dauert nur wenige Sekunden und endet in einer anterior-posterior Ausrichtung der Centrosomen zueinander (Abbildung 7.17 c, Abbildung 7.18 d). Die Drehrichtung des Centrosomen-Kern-Komplexes ($n=25$) kann mit dem Uhrzeigersinn (11/25) oder entgegengesetzt (14/25) verlaufen und scheint so dem Zufall überlassen zu sein.

Nach der Rotation in P_1 teilen sich beiden Zellen. Die AB-Zelle teilt sich gemäß der Centrosomenstellung zunächst transvers (Abbildung 7.17 d). In vivo wird durch den Druck der Schale die auseinanderweichende Spindel jedoch verschoben, so dass ABa und ABp schräg zueinander zu liegen kommen (Abbildung 7.18 e+f).

Während der Teilung von P_1 in P_2 und EMS wird ihr Spindelapparat ebenfalls in vivo durch den Gegendruck der Schale sowie durch die sich teilende AB aus seiner anterior-posterior Orientierung (Abbildung 7.17 c) in eine schräge Lage (Abbildung 7.18 e+f) verschoben.

Auf diese Weise bekommt P_2 Kontakt zu ABp. EMS markiert die Bauchseite des Embryos und das rhomboide 4-Zellstadium der Cephalobiden, Plectiden und von *C. elegans* ist entstanden und die dorso-ventrale Achse ist etabliert (Abbildung 7.18 f).

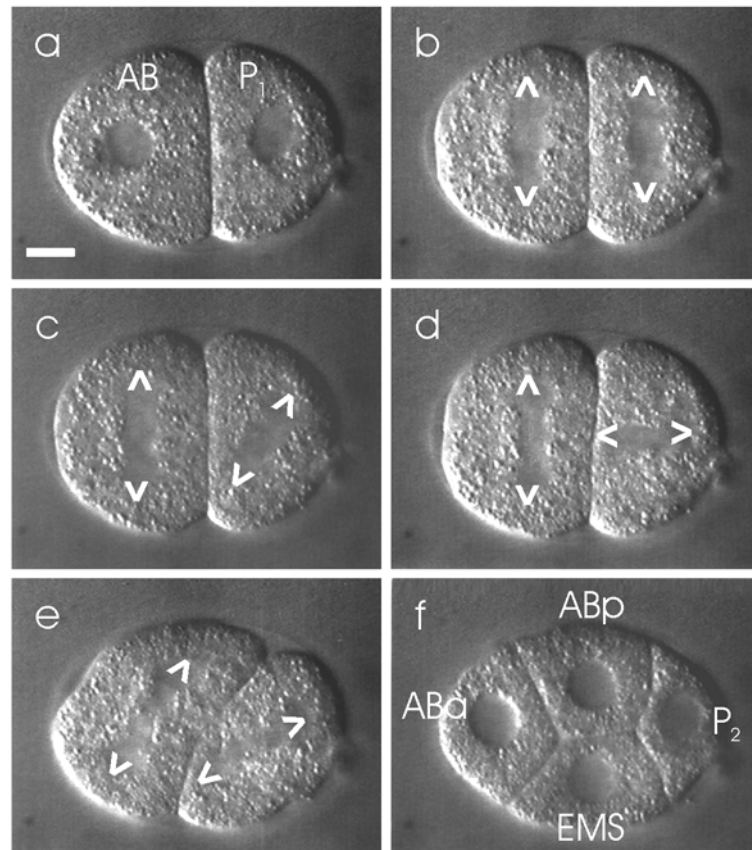


Abbildung 7.18: Bewegung der Mitosespindeln bei *Rhabditis* sp. während der Teilung von 2 nach 4 Zellen. < > markieren die Centriolen bzw. Centrosomen.
Anterior=links. Nomarski-optik. Eichstrich: 10µm

Da alle drei Raumachsen senkrecht aufeinander stehen, ist mit Etablierung der dorso-ventralen Achse auch der Verlauf der dritten Achse, der rechts-links Achse entschieden. Sie wird später durch die sich teilenden ABa und ABp in jeweils eine rechte und linke Tochterzelle deutlich.

Bei Plectiden tritt kurzzeitig die Besonderheit auf, dass die AB-Zellen ABa und ABp direkt nach ihrer Teilung noch transvers zueinander ausgerichtet sind (Abbildung 7.5 a). Aufgrund der sehr geräumigen, kugelähnlichen Schale erfährt die Teilungsspindel von AB keinen Gegendruck, so dass die Teilung zunächst strikt transvers gemäß der Centrosomenposition ablaufen kann. Nach der Teilung von P_1 ergibt sich aber auch bei Plectiden ein rhomboides 4-Zellstadium (Abbildung 7.5 b).

Obwohl jeweils beide Tochterzellen von AB und P_1 im 4-Zellstadium schräg zueinander liegen, bleibt doch festzuhalten, dass die Centrosomen in AB und P_1 vor der Teilung unterschiedlich orientiert sind: In P_1 findet zusätzlich zur Wanderung der Centriolen eine Rotation des Centrosomen-Kern-Komplexes statt, die in AB fehlt.

Entfernt man bei *C. elegans* jedoch vor diesen beiden Teilungen die Schale durch enzymatische Verdauung oder durch Natriumhypochlorid, sind die Spindeln sowohl von AB als auch von P_1 in der Lage, ihre jeweils ursprüngliche Ausrichtung aufrecht zu erhalten, so dass sich in diesen Fällen ein liegendes T-Muster ergibt wie in Abbildung 7.17 d (Hyman &

White, 1987). Später kugelt sich der Embryo ab, so dass es auch hier zum Kontakt von P_2 und ABp kommt. Durch den Kontakt wird eine Induktion der ABp durch P_2 möglich, die das Schicksal von ABp gegenüber dem von ABa verändert (Priess & Thomson, 1987). Marker für die Andersartigkeit sind die beiden von ABp stammenden, anfärbbaren "intestinal rectal valve cells" bei *C. elegans*.

7.5.2.2 Das lineare 4-Zellstadium als Übergangsform bei *D. coronatus* und *Protorhabditis* sp.

Die 4-Zellstadien und manchmal auch noch das 5-Zellstadium von *D. coronatus* (Abbildung 7.2 c) und *Protorhabditis* sp. als Übergangsform unterscheiden sich erheblich von dem rhomboiden 4-Zellstadium (Abbildung 5.6 g, Abbildung 7.5 b Abbildung 7.18 f).

Abbildung 7.19 und Abbildung 7.20 zeigen, was während der Entwicklung vom 2- zum 4-Zellstadium bei diesen beiden Spezies geschieht.

Mit der Teilung von P_0 erben AB und P_1 jeweils ein Centriol, das dem Kern anhaftet. Nach der Verdoppelung beginnen die Centriolen jeden Kernes wie bei den anderen untersuchten Nematoden mit ihrer Wanderung in entgegengesetzte Richtung, an deren Ende sie sich in einer transversen Position zueinander befinden (Abbildung 7.19 b).

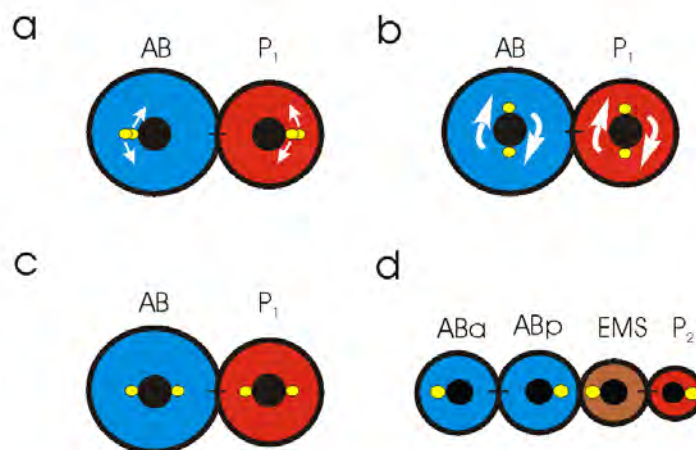


Abbildung 7.19: Schematische Darstellung der Centriolen bzw. Centrosomen während der Teilung von 2 nach 4 Zellen bei *D. coronatus* und *Protorhabditis* sp.

Schwarze Striche=Schwesterzellen, gelbe Kreise=Centriolen, weiße gerade Pfeile=Wanderung der Centriolen, gebogene weiße Pfeile= Rotation des Centrosomen-Kern-Komplexes.

In der P_1 rotiert nun wie bei den in Kapitel 7.5.2.1 untersuchten Nematoden der gesamte Centrosomen-Kern-Komplex innerhalb von wenigen Sekunden aus seiner transversen Ausgangslage derart, dass sich die Centriolen in einer anterior-posterior Ausrichtung zueinander befinden (Abbildung 7.19 c). Mit der folgenden Teilung von P_1 kommen die beiden Töchter EMS und P_2 in strikt anterior-posteriorer Anordnung zu liegen (Abbildung 7.19 d, Abbildung 7.20 b, c).

Obwohl bei diesen beiden Spezies also dieselbe Rotation des Centrosomen-Kern-Komplexes wie bei den in Kapitel 7.5.2.1 untersuchten Nematoden stattfindet, kann wahrscheinlich aufgrund der anderen Schalen- und damit Platzverhältnisse und der Tatsache, dass sich hier die P_1 als erste Zelle teilt und so nicht durch eine sich teilende AB wie bei *C. elegans* verschoben wird, die anterior-posteriore Richtung der Centrosomen aufrecht erhalten werden und die Teilung mit dieser Orientierung erfolgen.

Bei der AB-Zelle stellt sich die Situation anders dar. Ausgehend von einer transversen Stellung der duplizierten und gewanderten Centriolen zueinander (Abbildung 7.19 b) findet bei dieser Spezies dieselbe Rotation des Centrosomen-Kern-Komplexes wie in P_1 statt (Abbildung 7.19 b, c; Abbildung 7.20 b, c, d).

Auf diese Weise wird der Spindelapparat in eine anterior-posteriore Richtung verlagert, in dessen Richtung sich die AB-Zelle teilt (Abbildung 7.20 e).

Dies zusammen mit der vorausgegangenen Teilung der P_1 in ebenfalls strikter anterior-posterior Richtung bedingt, dass bei *D. coronatus* und *Protorhabditis* sp. die Blastomeren im 4-Zellstadium in einer Reihe angeordnet sind (Abbildung 7.19 d, Abbildung 7.20 f)

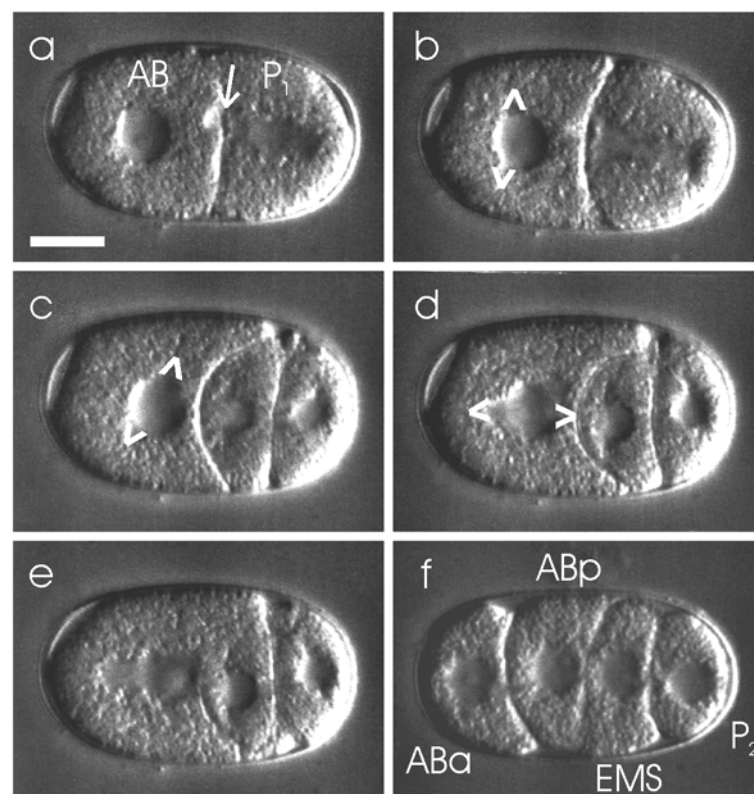


Abbildung 7.20: Bewegung der Mitosespindeln bei *D. coronatus* während der Teilung von 2 nach 4 Zellen. < > markieren die Centriolen bzw. Centrosomen, Pfeil=granulafreier Bereich. Anterior=links. Nomarskiopik. Eichstrich: 10µm

Während bei *C. elegans* und den meisten anderen Nematoden mit Erreichen des 4-Zellstadiums und Geburt der EMS als Bauchmarkerzelle die dorso-ventrale Achse und so ein 2-achsiger Embryo entsteht, ist bei *D. coronatus* und *Protorhabditis* sp. zu diesem Zeitpunkt trotz des bereits Vorhandenseins von 4 Zellen nur die anterior-posterior Achse etabliert und

der Verlauf der dorso-ventralen Achse noch nicht erkennbar. Je nach Schalenlänge kommen auch 5-Zellstadien vor, deren Blastomeren diese lineare Anordnung zeigen (Abbildung 7.2 c, Abbildung 7.23 a).

Kurz vor der Rotation des Centrosomen-Kern-Komplexes können im 2-Zellstadium von *D. coronatus* angrenzend an die anteriore Membran der P_1 und die posteriore Membran von AB granulafreie Bereiche beobachtet werden, die eindeutig intracellulär liegen (Abbildung 7.20 Pfeil). Die gleichen Strukturen lassen sich in P_2 ebenfalls kurz vor einer Centrosomen-Kern-Rotation beobachten. Bei *C. elegans* treten solche von Hyman (1989) beschriebenen Bereiche in P_1 im Zusammenhang mit der Konkurrenz der Mikrotubuli um eine Ansatzstelle auf.

7.5.2.3 Kontrolle der Teilungsspindel in der AB-Zelle von *D. coronatus* und *C. elegans*

In den Kapiteln über die Entstehung des 4-Zellstadiums (Kapitel 7.5.2 ff) wurde beschrieben, wie sich durch Abweichungen in der Ausrichtung der Teilungsspindel in der AB-Zelle von *C. elegans* und *D. coronatus* sowie *Protorhabditis* sp. räumliche Unterschiede der 4-Zellstadien ergeben.

Für die Steuerung der Spindelausrichtung sind für beide Muster (anterior-posteriore und transverse Orientierung) jeweils zwei verschiedene Mechanismen denkbar:

Entweder stellt die Ausrichtung der Teilungsspindel in der AB-Zelle einen autonomen Prozess dar, der unabhängig von äußeren Einflüssen ist. Oder die Positionierung ist ein von bestimmten Einflüssen wie zum Beispiel einer Induktion durch P_1 gesteuerter Vorgang, so dass sich bei dessen Störung ein anderes als das für die jeweilige Spezies bekannte Muster ergibt.

Um eine Induktion der AB durch P_1 zu überprüfen, wurde zunächst die Keimbahnzelle P_1 mit Hilfe des Lasers im frühestmöglichen Stadium sowohl bei *C. elegans* (n=6) als auch bei *D. coronatus* (n=10) ablatiert. Bei *C. elegans* bildete sich die Spindel in der AB-Zelle bei allen Embryonen in transverser Richtung aus. Auch die anschließende Teilung der AB-Zelle erfolgte mit dieser Orientierung. Es ergab sich in keinem der untersuchten Fälle eine Abweichung von der normalen Teilungssituation.

Auch bei *D. coronatus* konnte durch die Ablation von P_1 keine Änderung im Verhalten der AB-Zelle hervorgerufen werden. Die Spindel war bei allen Embryonen von Beginn an in anterior-posterior Richtung orientiert, so dass sich die AB-Zelle wie unter natürlichen Umständen anterior-posterior teilte (Abbildung 7.21). Es trat also auch bei dieser Spezies keine Veränderung gegenüber der Teilung im Normalfall auf.

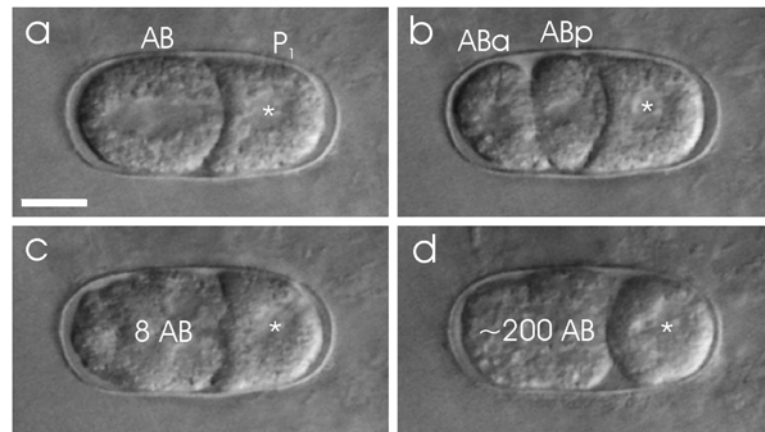


Abbildung 7.21: Ablation von P₁ bei *D. coronatus*. (a) anterior-posteriore Spindelausrichtung in AB, (b) Teilung in 2 AB-Zellen, (c) Teilung in 8 AB-Zellen, (d) terminaler Phänotyp mit ca 200 AB-Zellen und ablatierter P₁ am posterioren Pol. * ablatierte P₁. Nomarski-Optik. Eichstrich: 10µm

Um eine Einflussnahme auch einer toten P₁ zum Beispiel über die Zellmembran ausschließen zu können, wurde die P₁ direkt nach ihrer Entstehung in einer zweiten Versuchsreihe bei beiden Spezies durch ein zuvor in die Eischale gebranntes Loch aus dem Ei entfernt (Abbildung 7.22). Bei der Entnahme rutschte die in der Eihülle verbleibende AB-Zelle etwas nach posterior.

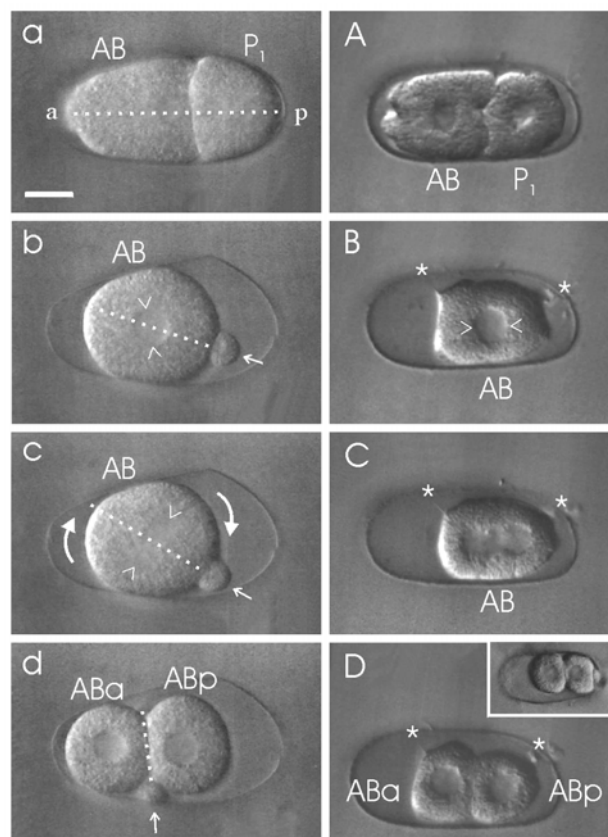


Abbildung 7.22: Elimination der P₁ kurz nach ihrer Entstehung bei *C. elegans* (a-d) und *D. coronatus* (A-D). Insert: anderer Embryo mit Rest von P₁ anhaftend. < >

Centrosomen, gebogene Pfeile=Drehung, gerader kleiner Pfeil=Rest von P_1 ,
 * Cytoplasmafäden und gestrichelte Linie als Orientierung. Anterior=links.
 Nomarskiptik. Eichstrich: 10 μ m

Abbildung 7.22a und A zeigen die Embryonen beider Spezies vor Entnahme der P_1 . Bei *C. elegans* (a) ist der Verlauf der anterior-posterior Achse durch eine gestrichelte Linie und die die Buchstaben a (anterior) und p (posterior) gekennzeichnet.

Bei *C. elegans* richtete sich die Spindel der AB nach Entfernung der P_1 in allen Fällen ($n=7$) transvers aus (Abbildung 7.22 b+c). Bei 5 der 7 Embryonen wurde ein kleiner Rest der P_1 an der AB anhaftend belassen, um die ehemalige Position der P_1 zu verdeutlichen. In den übrigen beiden Fällen wurde die P_1 komplett entfernt. Mit dem Auseinanderweichen der Spindelfasern begann die gesamte AB-Zelle in allen Fällen zu rotieren, bis die Teilungsrichtung anterior-posterior verlief (Abbildung 7.22 b, c, d).

Um zu zeigen, dass sich diese Rotation bei *C. elegans* nicht nur auf den Centrosomen-Kern-Komplex beschränkt wie bei der AB von *D. coronatus* bei der Entstehung des linearen 4-Zellstadiums (Kapitel 7.5.2.2), sondern die gesamte AB-Zelle erfaßt, ist einer der Fälle dargestellt, in denen ein kleiner Rest von P_1 in der Eischale verblieben ist (markiert mit kleinem geradem Pfeil in b, c, d). Vergleicht man seine Ausgangslage (Abbildung 7.22 b) mit der Lage, die er am Ende der Rotation einnimmt (Abbildung 7.22 d), wird die Bewegung, die die AB-Zelle vollzieht, deutlich. Zusätzlich verdeutlichen gebogene Pfeile die Drehung der AB-Zelle (c).

Bei *D. coronatus* ($n=8$) wurde P_1 in 5 Fällen komplett (A-D) und bei den restlichen 3 Embryonen bis auf einen kleinen Rest herausgenommen (Insert). Bei dem in Abbildung 7.22 A-D gezeigten Fall wurde als Orientierungshilfe ein Embryo ausgewählt, bei dem anterior ein gespannter Faden und posterior ein kleiner Rest von P_1 zu erkennen ist (*). Durch die gleiche Position dieser Marker in der Ausgangs- (B) wie in der Endsituation (D) wird deutlich, dass keine Rotation oder sonstige bedeutende Lageveränderung der AB während des Experiments stattgefunden hat. Das Insert stellt einen weiteren Fall mit größerem, anhaftendem P_1 -Rest dar. In allen Experimenten richtete sich die Teilungsspindel in AB von Beginn an anterior-posterior aus (Abbildung 7.22 B,C), so dass auch die anschließende Teilung in dieser Richtung erfolgte (Abbildung 7.22 D).

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich bei *C. elegans* in allen Fällen von Ablation und Elimination der P_1 -Zelle die Spindel der AB wie bei unbehandelten Embryonen transvers ausrichtete. Anschließend rotierte die gesamte AB-Zelle während ihrer Teilung, bis die Spindel und damit die Teilungsrichtung anterior-posterior war. Wahrscheinlich weicht die AB-Zelle mit der Rotation dem größer werdenden Druck der sich verlängernden Spindelfasern gegen die Eischale aus. Da der Gegendruck einer sich teilenden P_1 -Zelle fehlt, können sich die Tochterzellen ABa und ABp in anterior-posterior Richtung ausrichten, anstatt eine Schräglage wie im unbehandelten Embryo einzunehmen. Die Rotation der AB-Zelle ist also artifiziell.

Bei *D. coronatus* formierte sich die Spindel vom Zeitpunkt des Sichtbarwerdens wie bei unbehandelten Embryonen in anterior-posterior Richtung. Ob die Centriolen auch unter

experimentellen Bedingungen zuvor eine transverse Stellung zueinander eingenommen haben und anschließend eine Centrosomen-Kern-Rotation wie im unbehandelten Embryo stattfand, lässt sich nicht nachweisen. Da sich die Spindelfasern bei *D. coronatus* anders als bei *C. elegans* in anterior-posterior Richtung verlängern, erfahren sie keinen Gegendruck der Schale, so dass bei *D. coronatus* keine Drehung der gesamten AB-Zelle auftritt.

Bei beiden Spezies schien der Verbleib eines kleinen Restkörpers von P_1 keinen Einfluss auf die Ausbildung und Orientierung der Spindel in AB zu nehmen. Es machte also keinen Unterschied, ob P_1 durch ein Loch in der Eihülle entfernt oder nur ablatiert wurde.

Der Vorgang der Spindelausrichtung lässt sich bei beiden Spezies nicht beeinflussen. Obwohl die Orientierung der Spindel mit anschließender Teilung der AB-Zelle bei *C. elegans* und *D. coronatus* senkrecht zueinander stattfindet, scheint sie bei beiden Spezies ein zellautonomer Prozess zu sein.

7.5.2.4 Auflösung des Übergangsstadiums: Das rhomboide 4-Zellstadium bei *D. coronatus* und *Protorhabditis* sp.

Bei *D. coronatus* und *Protorhabditis* sp. unterscheiden sich das lineare 4-Zellstadium und manchmal auch noch das frühe lineare 5-Zellstadium (Abbildung 7.23 a) sehr von dem rhomboiden 4-Zellstadium bei *C. elegans* (Abbildung 5.6 g) und vielen anderen Nematoden.

Um die lineare Anordnung aufzulösen und die dorso-ventrale Achse zu etablieren (und mit ihr die rechts-links-Achse), sind beträchtliche Zellwanderungen und Zellverschiebungen nötig. In Abbildung 7.23 sind diese Zellbewegungen, die ungefähr 45 bis 50 min dauern, dargestellt.

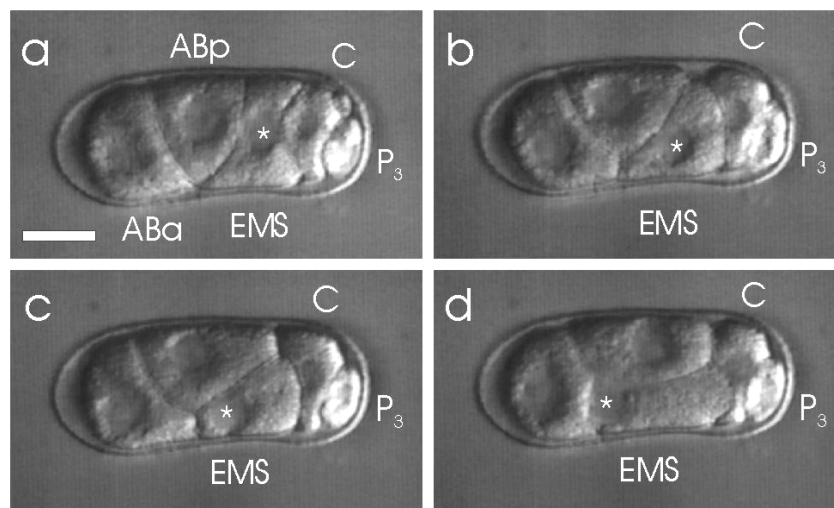


Abbildung 7.23: Etablierung der dorso-ventralen Achse bei *D. coronatus*. (a) alle 5 Blastomeren sind linear angeordnet, EMS zu einer Seite verbreitert, ABp zur anderen Seite (b) – (d) EMS und ABp lösen sich zunehmend von einer Seite, drehen sich umeinander. * Kern der EMS-Zelle. Anterior=links.
Nomarskiopik. Eichstrich: 10µm

Beginnend mit dem frühen 5-Zellstadium deuten sich die ersten Zellbewegungen mit einer Verbreiterung der Basis der EMS sowie der ABp zu jeweils entgegengesetzten Seiten an (Abbildung 7.23 a). Im weiteren Verlauf schreitet die Verbreiterung weiter voran und EMS wie ABp verlieren jeweils den Kontakt zu einer Seite des Embryos. EMS erhält dabei Kontakt zu ABa. (Abbildung 7.23 b). Der Kern der EMS verlässt seine Mittelposition und rutscht in den sich vergrößernden Teil der Zelle. ABp und vor allem EMS verändern mehr und mehr ihre ursprüngliche Form. Zunehmend füllt ABp die zwischen EMS und der Eihülle entstandene Lücke aus (Abbildung 7.23 c).

In Abbildung 7.23 d liegen EMS und ABp flächig den gegenüberliegenden Seiten an und die Zellverschiebungen sind abgeschlossen.

Auffallend ist, dass die Zellen ABa, C und P₃ sowohl ihre Lage als auch ihre Form während der gesamten Zeit beibehalten haben. De facto haben sich nur EMS und ABp um 90° umeinander gedreht. Mit der Auflösung der linearen Anordnung in ein *C. elegans* ähnliches räumliches Muster sind die Voraussetzungen für die Gastrulation erfüllt und sowohl die dorso-ventrale als auch die rechts-links Achse des Embryos etabliert.

7.5.2.4.1 Kontrolle der EMS-ABp-Verschiebung bei *D. coronatus*

Um herauszufinden, ob ABp oder EMS die treibende Kraft für die in Kapitel 7.5.2.4 beschriebenen Zellbewegungen ist, wurden jeweils ABp (n=3) und EMS (n=3) ablatiert. Abbildung 7.24 zeigt die Geschehnisse nach einer ABp-Ablation im linearen 5-Zellstadium.

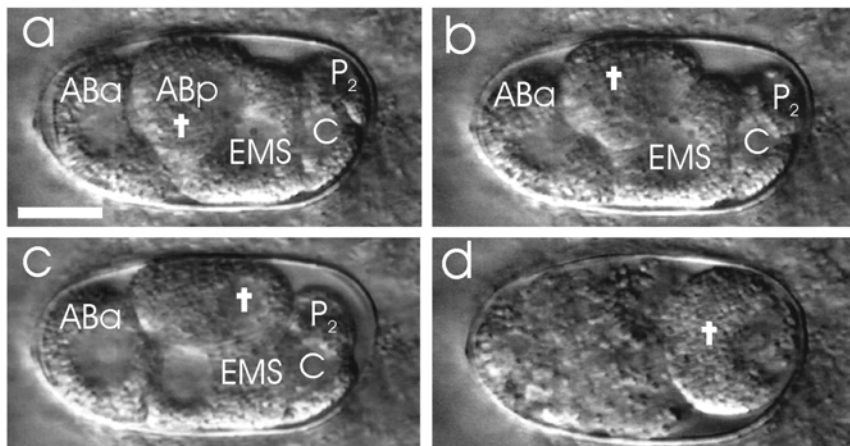


Abbildung 7.24: Ablation von ABp und deren Verlagerung an den posterioren Pol bei *D. coronatus*. (a) Ausgangsstadium, (b) Kontaktaufnahme von EMS zu ABa, (c) ablatierte ABp lateral verschoben, (d) terminaler Phänotyp. Kreuz=ablatierte ABp-Zelle. Anterior=links. Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

In (a) sind die 5 Blastomeren noch weitgehend in einer Reihe angeordnet. Die ablatierte ABp ist mit einem Kreuz gekennzeichnet. Im folgenden Bild (b) hat ABp die lineare Anordnung verlassen. Deutlich ist zu erkennen, dass sie abgekugelt ist. Die EMS-Zelle hat Kontakt zu ABa aufgenommen. In (c) und (d) hat ABp den Kontakt zum Zellverband verloren und wird isoliert an den posterioren Pol des Embryos verlagert (d). Die EMS-Zelle dagegen zeigt ein Verhalten wie bei unbehandelten Embryonen. Sie verformt sich und hält Kontakt zu ABa.

Auch der Kern der EMS ist wie bei unbehandelten Embryonen der ABa zugewandt (b+c). Alle intakten Zellen teilen sich vielfach bis zum terminalen Phänotyp weiter (d).

Abbildung 7.25 zeigt das Verhalten der Zellen nach einer EMS-Ablation im linearen 4-Zellstadium.

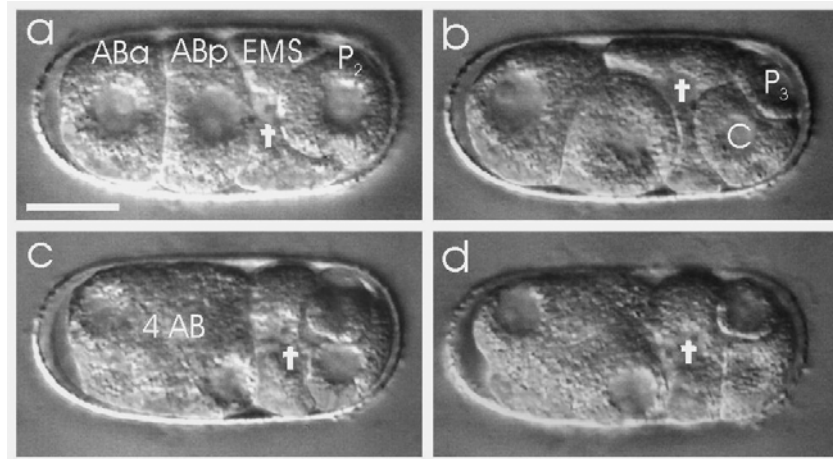


Abbildung 7.25: Ablation von EMS bei *D. coronatus*. (a) Ausgangsstadium, lineares 4-Zellstadium, (b) – (d) ablatierte EMS bleibt unverändert liegen, es findet keine Etablierung der dorso-ventralen Achse statt. Kreuz=ablatierte EMS-Zelle. Anterior=links. Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

Kurz nach der Ablation sind die 4 Blastomeren linear angeordnet (a). Die ablatierte EMS ist mit einem Kreuz gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf bleibt EMS wie ein Block zwischen den anderen Zellen liegen (b, c, d), während die übrigen Zellen sich weiter teilen bis nach ungefähr 19 h der terminale Phänotyp erreicht ist (Abbildung 7.26). Es findet keine Reorganisation des linearen Stadiums im Sinne einer Etablierung der dorso-ventralen Achse wie bei Ablation der ABp statt. Die ablatierte EMS wird erst relativ spät aus dem Verband ausgeschleust und an den posterioren Pol verlagert (Abbildung 7.26).

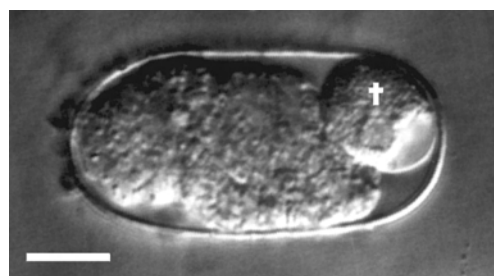


Abbildung 7.26: Terminaler Phänotyp 19h nach EMS-Ablation bei *D. coronatus*.

Kreuz=ablatierte EMS-Zelle. Anterior=links. Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

Mit diesen beiden Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass EMS aktiv für die Zellverschiebungen verantwortlich ist. Nach ABp-Ablation nimmt die EMS nach wie vor Kontakt zu ABa auf und verlagert sich zu einer Seite des Embryos. Sie verhält sich weitgehend wie im unbehandelten Embryo. Die EMS-Zelle wird nicht durch ABp an ihre neue Position geschoben, sondern führt die Wanderung aktiv aus und verschiebt dabei die passiv bleibende ABp.

7.6 Frühe räumliche Musterbildung

7.6.1 Frühe räumliche Musterbildung bei *D. coronatus*

7.6.1.1 Variationen in der frühen räumlichen Musterbildung bei *D. coronatus*

Die in Kapitel 7.5.2.4 beschriebene Umwandlung des linearen 4- oder 5-Zellstadiums in eine rhomboide Form wird als ein typischer Entwicklungsprozess ein und desselben Embryos betrachtet und stellt daher keine Variation zwischen zwei verschiedenen Embryonen da.

Ausgehend vom 4-Zellstadium treten bei *D. coronatus* aber andere, grundsätzliche Variationen in der frühen räumlichen Musterbildung auf. Abhängig von der individuellen Schalenlänge des Embryos ergeben sich mit der Teilung von P_2 unterschiedliche räumliche Anordnungen der Tochterzellen C und P_3 .

Obwohl die Teilungsspindel der P_2 zunächst immer in anterior-posterior Richtung orientiert ist, kann sie in Embryonen mit relativ kurzer Eischale durch ihr Auseinanderweichen und den Gegendruck der Schale in eine schräge bis transverse Lage verschoben werden, ähnlich wie die der AB und P_1 bei *C. elegans*. Auf diese Weise kommen C und P_3 in transverser Ausrichtung zur anterior-posterior Achse zu liegen (Abbildung 7.27 a).

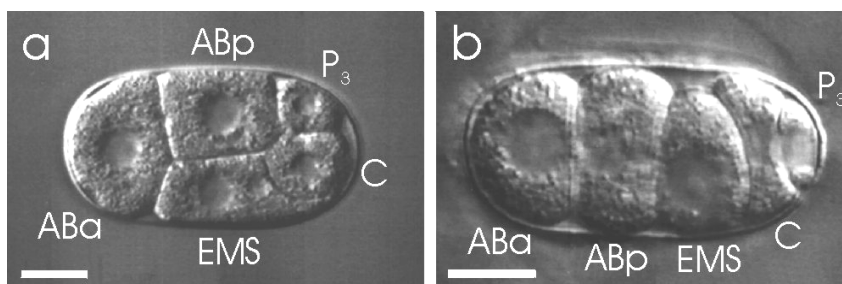


Abbildung 7.27: Räumliche Anordnung bei unterschiedlich langen Schalen von *D. coronatus*.

(a) kurze Schale: C und P_3 transvers angeordnet (EMS-ABp-Verschiebung schon stattgefunden), (b) lange Schale: C und P_3 longitudinal angeordnet (EMS-ABp-Verschiebung noch nicht stattgefunden). Anterior=links.

Nomarski-optik. Eichstrich: 10µm

Bei Embryonen mit langer Schale und relativ viel Platz nach posterior kann die anterior-posterior Ausrichtung der sich teilenden P_2 aufrecht erhalten werden, so dass die Nachkommen C und P_3 ebenfalls anterior-posterior zueinander orientiert sind und die lineare Anordnung auch im 5-Zellstadium beibehalten werden kann (Abbildung 7.27 b).

Abbildung 7.28 fasst die Variationen in der frühen räumlichen Musterbildung bei *D. coronatus* zusammen. Für eine transverse Stellung von C und P_3 bei kurzen Schalen gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten. Da zu diesem Zeitpunkt der Übergang des linearen Stadiums in ein rhomboides Stadium erfolgt, kann die Position der EMS-Zelle als Fixpunkt für eine Definition der Lage dienen.

Zum einen kann die neu entstehende Keimbahnzelle P_3 (rot) in unmittelbarer Nachbarschaft zur EMS-Zelle (orange) zu liegen kommen. Die C-Zelle (grün) nimmt bei diesen Embryonen

eine maximal weit entfernte Position relativ zur EMS ein (Abbildung 7.28-A, Abbildung 7.27a). Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass C und P_3 in vertauschter Lage zu dem oben beschriebenen Fall entstehen. Dies bedeutet, dass nun nicht die P_3 -Zelle in direkter Nachbarschaft zur EMS zu liegen kommt, sondern ihre Schwesterzelle C. Die Keimbahnzelle nimmt in diesen Fällen hingegen die maximal weit entfernte Position zu EMS ein, bei der kein Membrankontakt zwischen EMS und P_3 besteht (Abbildung 7.28-B).

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die Lage der C-Zelle in diesen Fällen und auch in den Fällen einer anterior-posterior Teilung der P_2 bei langen Schalen den Kontakt der neugeborenen P_3 zur EMS verhindert. Dies ist wichtig für Überlegungen zu möglichen Induktionen an späterer Stelle.

Welche der beiden Möglichkeiten einer transversen Lage der Tochterzellen C und P_3 bei der Teilung der P_2 besprochen wird, hängt von der Drehrichtung der Teilungsspindel ab und scheint dem Zufall überlassen zu sein. Eine Auswertung der Verteilung ($n=22$) ergab ungefähr ein 50:50-Ergebnis mit 12/22 mit Drehung im Uhrzeigersinn und 10/22 mit entgegengesetzter Drehrichtung der Spindel.

Die Länge der Eischale ist ein stufenlos variierender Parameter, der nicht nur die beiden extremen Positionen kurz oder lang, sondern auch sämtliche dazwischen liegende Werte einnehmen kann, so dass der Winkel, um den die sich verlängernde Teilungsspindel verschoben wird wenn sie an die Schale stößt, ebenfalls alle Werte zwischen 0° (anterior-posterior) und 90° (transvers) annehmen kann. Auf diese Weise können die Tochterzellen von P_2 jede schräge Position zwischen den beiden Extremstellungen anterior-posterior und transvers einnehmen. Der Grad der Ausprägung hängt also von der individuellen Schalenlänge des Embryos ab.

In Abbildung 7.28-A und -B sind nur die beiden extrem transversen Varianten dargestellt.

Bei der nächsten Teilung der Keimbahn (Abbildung 7.28-A1, -A2, -B1, -B2), der Teilung von P_3 , bestehen theoretisch die gleichen Variationsmöglichkeiten wie bei der Teilung von P_2 . In der Praxis konnte jedoch kein Embryo mit dermaßen langer Schale, bei dem auch die Teilung der P_3 anterior-posterior verläuft, beobachtet werden.

Wie bei der Teilung der P_2 bestehen für die Positionierung der Tochterzellen der P_3 dieselben Abhängigkeiten von der Schalenlänge und der Drehrichtung der Teilungsspindel. Die Spindel der P_3 richtet sich dabei zunächst anterior-posterior aus und wird dann während ihrer Verlängerung mehr oder weniger stark nach ventral (im Uhrzeigersinn) oder dorsal (entgegen dem Uhrzeigersinn) gedreht. Dabei scheint auch hier die Drehrichtung der Spindel dem Zufall überlassen zu sein. Bei den 22 untersuchten Fällen ergab sich bei dieser Teilung ein exaktes 50:50-Verhältnis. Die aus dieser Teilung hervorgehenden Töchter D (pink) und P_4 (rot) unterliegen somit den gleichen Voraussetzungen wie C und P_3 eine Teilungsrunde zuvor.

Da die Drehrichtung der P_3 -Spindel unabhängig von der Lage der Zelle selbst ist und P_3 wie oben beschrieben bei ihrer Entstehung selbst entweder maximal weit von EMS entfernt oder in deren direkter Nachbarschaft zu liegen kommen kann, ergeben sich für die Position der Zellen C, D, und P_4 zueinander vier verschiedene Muster bei Verschiebung der Spindel um

90° (Abbildung 7.28-A1, -A2, -B1, -B2). Die vier verschiedenen Mustervarianten sind dabei gleich häufig vertreten.

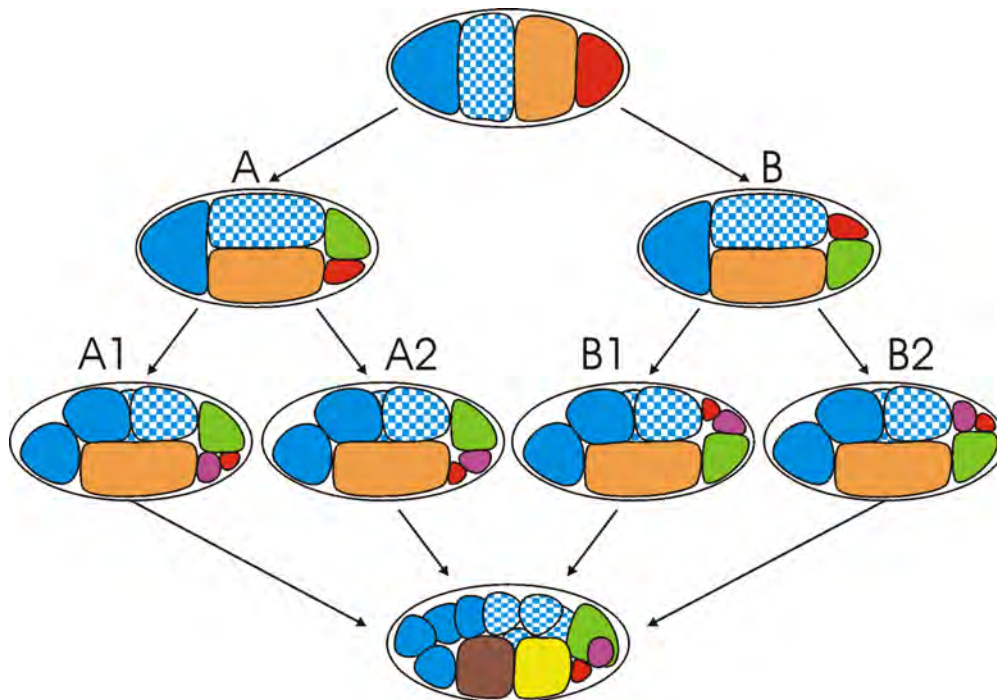


Abbildung 7.28: Variationen in der räumlichen Musterbildung bei *D. coronatus*.

Farbcodierung: ABa = blau, ABp = blau-weiß kariert, EMS = orange, MS = braun, E = gelb, C = grün, D = pink, Keimbahn P₁ bis P₄ = rot.

Die relativen Positionen der Zellen EMS, C und P₃ bzw. D und P₄ zueinander lassen bei *D. coronatus* Variationen zu, die bis zum Beginn der Einwanderung von E erhalten bleiben. Danach münden jedoch alle Varianten in ein gemeinsames Muster und ein Ereignis, das in Kapitel 7.6.1.2 beschrieben wird, findet bei allen Embryonen von *D. coronatus* statt.

7.6.1.2 Resultierendes Muster aller räumlichen Varianten von *D. coronatus*

Obwohl bei *D. coronatus* in der sehr frühen Embryogenese mehrere räumliche Mustervarianten auftreten (Kapitel 7.6.1.1), kommt es doch bei allen Varianten zu demselben Ereignis der Kontaktaufnahme der Keimbahnzelle P₄ mit der E-Zelle vor deren nächster Teilung.

Bei der Teilung von P₃ besteht zum einen die Möglichkeit, dass P₄ unter bestimmten Bedingungen direkt neben EMS geboren wird (Abbildung 7.28-A2). In diesen Fällen bleibt der Kontakt entweder bis zur Entstehung von E erhalten oder wird ab einem bestimmten Zeitpunkt wieder hergestellt, so dass auch nach der Teilung von EMS die P₄-Zelle E berührt. Bei anderen Zellkonstellationen wird die E-Zelle jedoch regelrecht von Teilen der C- oder auch der D-Zelle abgeschirmt (Abbildung 7.28-A1, -B1, -B2). In diesen Fällen konnte eine zielgerichtete Wanderung der P₄ zur E-Zelle beobachtet werden (n=6). Dabei war es unerheblich, wo sich die Keimbahnzelle zu Beginn ihrer Wanderung befand. In den meisten Fällen wurde P₄ zunächst offenbar passiv in eine Lücke geschoben, auch wenn dies zunächst eine zunehmende Entfernung von der E-Zelle bedeutete.

Erst nach der Teilung der EMS-Zelle begann sich die P_4 plötzlich mit einer erstaunlich geradlinigen Bewegung auf die E-Zelle zuzubewegen. In den meisten Fällen wanderte die C-Zelle dabei zuvor in eine Position auf der linken Seite des Embryos und gab so den Weg für die Wanderung von P_4 frei. Die Barrikade, die der Zellkörper der D-Zelle für die Wanderung der P_4 bei bestimmten räumlichen Varianten darstellte, wurde überwunden, indem sich die Keimbahnzelle abflachte und über die D quetschte, um dann ihre endgültige Position direkt neben der E-Zelle einzunehmen.

In 3 von 6 beobachteten Fällen erfolgte die Kontaktaufnahme zwischen E und P_4 ungefähr nach 104 min (100, 103, 108) nach der Entstehung von E. Bei den anderen drei Embryonen entstand der Kontakt schon nach knapp 30 min (25, 25, 32) nach der Teilung von EMS.

In allen untersuchten Fällen hatte sich ein Kontakt also vor der Teilung der E-Zelle von einer in zwei Zellen ergeben. Offensichtlich führt eine zunächst wahllose Position von P_4 früher oder später immer zu einem Kontakt mit der E-Zelle. Ob dabei eine schnelle und eine langsame Variante existieren, wie es hier den Anschein hat, kann nicht abschließend geklärt werden. P_4 teilt sich anschließend in wahrscheinlich gleichwertige Töchter (Tabelle 2, Abbildung 7.30).

Da unabhängig von der räumlichen Anordnung um den Zeitpunkt der Geburt von P_4 diese Formation bei jedem Embryo beobachtet werden konnte, ist anzunehmen, dass der Kontakt zwischen der P_4 und der E-Zelle für die weitere Entwicklung zwingend erforderlich ist.

7.6.2 Frühe räumliche Musterbildung bei Plectiden

Anders als *D. coronatus* folgen Plectiden in ihrer Embryogenese einer ähnlich starren räumlichen Musterbildung wie *C. elegans*. Individuelle Variationen in der Anordnung einzelner Blastomeren zueinander treten bei den untersuchten Plectiden weder intra- noch interspezifisch auf, so dass die dargestellten Anordnungen der einzelnen Zellen (Vergleich der Embryogenese von „P. mekong“ (Abbildung 7.5) und *P. minimus* (Abbildung 7.31)) beispielhaft sind.

Im Vergleich mit *C. elegans* treten jedoch einige Unterschiede in der frühen räumlichen Musterbildung auf. Da die Schale von Plectiden annähernd kugelförmig ist, können sich die beiden AB-Zellen des 3-Zellstadiums (Abbildung 7.5 a) transvers zueinander ausrichten, ohne vom Druck der Schale beeinflusst zu werden. Auch im frühen 4-Zellstadium bleibt diese T-förmige Anordnung noch bestehen (Abbildung 7.31 a). Im späteren 4-Zellstadium kugelt sich der Embryo jedoch ab und nimmt ein rhomboides Muster (Abbildung 7.31 b) ähnlich *C. elegans* ein.

Auch nach der Teilung von EMS ergeben sich im 8-Zellstadium (Abbildung 7.5 c) Unterschiede zu *C. elegans* vor allem bezüglich der Lage der MS- und E-Zelle. Abbildung 7.29 stellt das 8-Zellstadium von „P. mekong“ dem von *C. elegans* gegenüber.

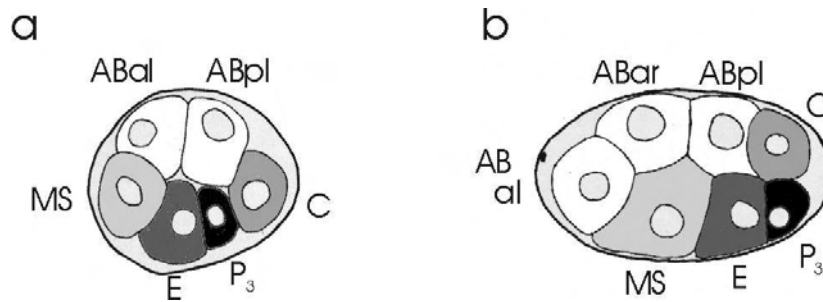


Abbildung 7.29: Räumliche Musterbildung im 8-Zellstadium von „P. mekong“ und *C. elegans*, Lahl *et al.* 2003.

Bei Plectiden (a) nimmt MS die anteriorste Position im Embryo ein. Auch die E-Zelle befindet sich in der anterioren Hälfte des Embryos. Anschließend folgt nach posterior die Keimbahnzelle P₃. Dies wird auch im 12-Zellstadium sehr deutlich (Abbildung 7.5 d).

Bei *C. elegans* (b) dagegen befindet sich MS zwar auch in der anterioren Hälfte, vor ihr liegt jedoch ABal. Die E-Zelle dagegen ist in der posterioren Hälfte des Embryos positioniert. P₃ bildet den posterioren Pol des Embryos.

Auf die Gastrulation und die Etablierung der bilateralen Symmetrie wird in gesonderten Kapiteln eingegangen (Kapitel 7.7 und Kapitel 7.8).

7.7 Gastrulation und Darmzellendifferenzierung

7.7.1 Einwanderung der Darmvorläuferzellen bei *D. coronatus*

Nach der Reorganisation des linearen Stadiums liegt am Ende des 5-Zellstadiums mit einem *C. elegans* ähnlichen Muster eine zweilagige Zellanordnung vor, die Voraussetzung für eine spätere Gastrulation ist (Kapitel 7.5.2.4). Im Zuge weiterer Zellteilungen, wie sie in der Tabelle 2 für *D. coronatus* dargestellt sind, teilt sich die EMS-Zelle und begründet als einzige somatische Zelle selbst wiederum die beiden somatischen Zelllinien E und MS. Kurz vor ihrer Teilung liegt E flächig der Ventralseite an (Abbildung 7.2 e).

Mit der Teilung von E im 25-Zellstadium entstehen die beiden Darmvorläuferzellen Ea und Ep. Sie liegen an der Bauchseite des Embryos. Anterior von ihnen bilden die vier MS-Zellen einen spitzen Winkel. Posterior grenzt die zuvor geteilte Keimbahn mit den P₄-Töchtern an (Abbildung 7.2 f). Bei der nun einsetzenden Gastrulation lösen sich die beiden Darmvorläuferzellen Ea und Ep von der Ventralseite und beginnen sich auf ihrer Wanderung ins Innere des Embryos zwischen die anderen Zellen zu schieben und diese auseinander zu drängen. Auf ihrem Weg ins Zentrum des Embryos hinterlassen die beiden Zellen eine Lücke, die anterior von MS-Zellen, lateral von AB-Zellen und posterior von den beiden P₄-Töchtern, die den E-Zellen bald folgen, begrenzt wird. Sie wird bald durch sich entgegenkommende ABal-Nachkommen von anterior und C-Zellen von posterior geschlossen. Die Einwanderung der E-Zellen ist abgeschlossen, wenn die Darmvorläuferzellen ihre endgültige Lage in der Mitte des Embryos erreicht haben.

Hinsichtlich der Herkunft der beiden Darmvorläuferzellen Ea und Ep sowie ihrer Verlagerung in das Zentrum des Embryos folgt die Gastrulation von *D. coronatus* der von *C. elegans* (Abbildung 7.32 a+b).

Ein bemerkenswerter Unterschied zu *C. elegans* ist jedoch die frühe Teilung von P₄ (Tabelle 2, Abbildung 7.35) in zwei Töchter vermutlich mit Keimbahncharakter. Beide Nachkommen sind gleich groß und haben einen stark reduzierten Dottergehalt (Abbildung 7.30). Da die Keimbahnzellen von *D. coronatus* jedoch insgesamt nicht auf eine Antikörpermarkierung mit K76 und L416 ansprechen (Kapitel 6.8), kann das Schicksal der P₄-Töchter nicht abschließend geklärt werden. Ein weiterer wichtiger Hinweis auf Gleichwertigkeit und Keimbahncharakter beider Zellen ist jedoch ihre Einwanderung direkt nach den E-Zellen, ihre beständige enge Nachbarschaft zu E und ein langes Aussetzen weiterer Teilungsaktivität (Abbildung 7.35). Es ist anzunehmen, dass es sich hier um die Äquivalente von Z2 und Z3 handelt, die bei *C. elegans* erst ungefähr im 100-Zellstadium geboren werden (Deppe *et al.*, 1978).

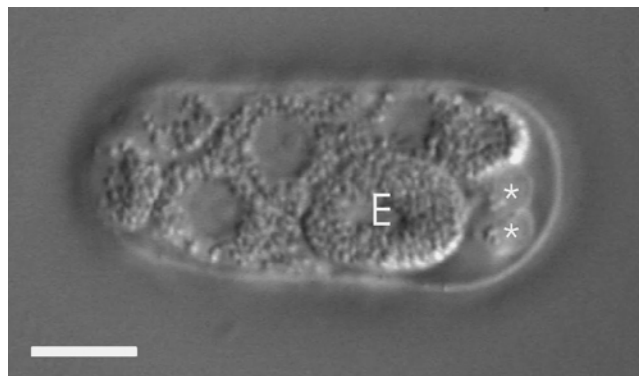


Abbildung 7.30: P₄-Töchter (*) mit stark reduziertem Dottergehalt bei ca. 24-zelligem Embryo von *D. coronatus*. E-Zelle kurz vor der Teilung. anterior=links. Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

7.7.2 Einwanderung des Darmvorläufers bei Plectiden bei *Plectus* sp. und *Anaplectus* sp.

Abbildung 7.29 zeigt die räumliche Anordnung der Zellen im 8-Zellstadium von „P. mekong“ kurz vor der Gastrulation. Durch die bei Plectiden während der Teilung von vier nach acht AB-Zellen stattfindende Drehung des gesamten Embryos von einer seitlichen Lage auf seine Dorsalseite (Abbildung 7.5 c+d, Abbildung 7.31 c+d) ist die Ventralseite dem Betrachter zugewandt und die Reihenfolge MS, E, P₃ von anterior nach posterior wird im 12-Zellstadium besonders deutlich.

Bei „P. mekong“ im 12-Zellstadium, bei *P. aquatilis* im 14-Zellstadium, bei *P. minimus* und anderen *Plectus*-Spezies sogar direkt nach ihrer Entstehung im 8-Zellstadium (Tabelle 3) beginnt die E-Zelle als einzelne Zelle mit ihrer Wanderung ins Zentrum des Embryos. Die Keimbahn, die zu diesem Zeitpunkt noch als P₃ vorliegt, behält dabei ständig Kontakt zu ihr. Sobald P₄ entstanden ist, beginnt auch sie mit ihrer Einwanderung und folgt der E-Zelle ins Zentrum.

Die Immigration der E-Zelle der Plectiden wird beispielhaft bei *P. minimus* (Abbildung 7.31) und „*P. mekong*“ (Abbildung 7.5) dargestellt. Bei den anderen untersuchten *Plectus*- und *Anaplectus*-Spezies verläuft die Einwanderung der Darmvorläuferzelle in gleicher Weise.

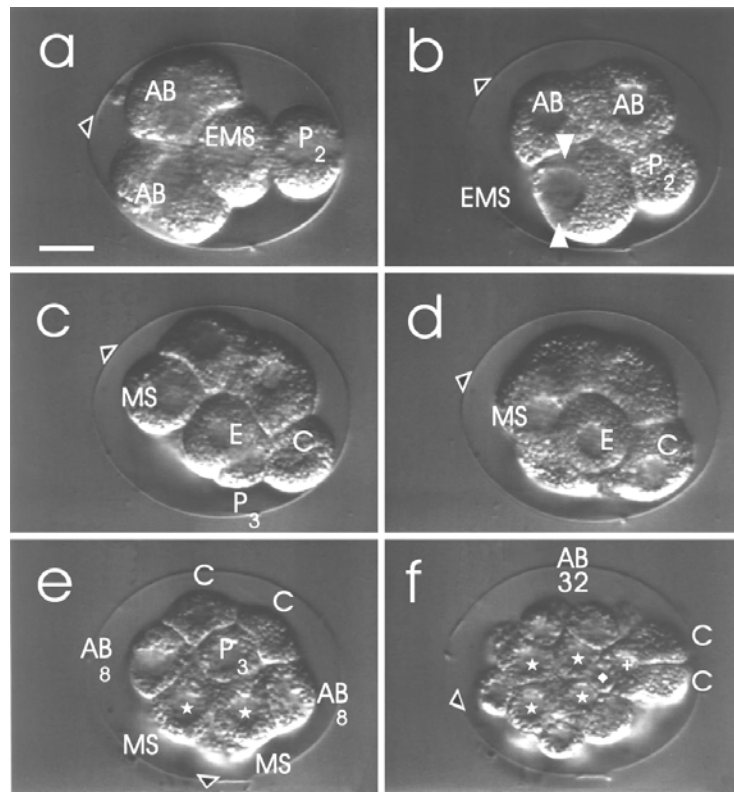


Abbildung 7.31: Frühe Embryogenese von *Plectus minimus*, Lahl *et al.*, 2003. (a) frühes 4-Zellstadium, (b) spätes 4-Zellstadium, weiße gefüllte Dreiecke markieren die transvers ausgerichtete Spindel von EMS, (c) 8-Zellstadium, Rotation der EMS-Spindel resultiert in einer anterior-posterior Position von MS und E, (d) 8-Zellstadium, zentrale Fokusebene, Beginn der Einwanderung von E und Rotation zu einer Ventralansicht, (e) 14-Zellstadium, ventrale Fokusebene, E-Zelle ist eingewandert, (f) 44-Zellstadium, ventrale Fokusebene, P₄ teilweise eingewandert. AB₈ bzw. AB₃₂=eine von 8 bzw. 32 AB-Zellen, * MS-Zellen, ♦ P₄, + D-Zelle, Orientierung anterior=links, anteriorer Pol=△, a-c linke Lateralansicht, d-f Ventralansicht. Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

Abbildung 7.5 d zeigt die ventrale Zelllage eines 12-Zellstadiums von „*P. mekong*“ zu Beginn der Gastrulation. Deutlich ist zu erkennen, dass sich die E-Zelle schon nicht mehr im Fokus befindet, sondern bereits auf dem Weg ins Zentrum abgesunken ist. Nur noch ein kleiner Anteil schaut nach oben heraus. MS, P₃ und die seitlich flankierenden AB-Zellen befinden sich dagegen an der Oberfläche des Embryos. Kurze Zeit später, im 14-Zellstadium, ist die E-Zelle bereits komplett eingewandert und in der zentralen Fokusebene zu sehen (e).

Bei *P. minimus* beginnt die Gastrulation schon während der Rotation des Embryos auf seine Dorsalseite im 8-Zellstadium (Abbildung 7.31 d). Auch hier wandert nur eine E-Zelle zu einem sehr frühen Zeitpunkt ein. Schon im 14-Zellstadium (e) sind keine Anteile von E mehr an der Oberfläche des Embryos zu erkennen.

Bei allen untersuchten *Plectus*-Spezies wird der Großteil der Lücke, die E bei ihrer Immigration hinterlassen hat, sehr schnell durch MS-Zellen nach antero-ventral hin verschlossen (Abbildung 7.5 f, Abbildung 7.31 e+f).

Nach posterior-ventral wird die Lücke durch die einwandernde Keimbahnzelle P₄ ein wenig länger offen gehalten, dann aber bald durch die D-Zelle und die sich weiter teilenden MS-Zellen verschlossen.

Allen untersuchten *Plectus*- und *Anaplectus*-Spezies ist gemein, dass anders als bei *C. elegans* und *D. coronatus* die Einwanderung der Darmvorläuferzelle ein nur kurz währender Prozess ist, der zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Embryogenese mit nur einer E-Zelle erfolgt. Erst wenn die E-Zelle ihre endgültige Position im Zentrum des Embryos eingenommen hat, teilt sie sich zu einem recht späten Zeitpunkt in Ea und Ep.

Auch folgt die Keimbahnzelle P₄ der E-Zelle recht bald ins Zentrum. Bei *C. elegans* erfolgt die Einwanderung der Keimbahn durch die Töchter der P₄ Z2 und Z3 ungefähr im 100-Zellstadium und damit deutlich später als bei Plectiden.

Es findet also bei allen untersuchten *Plectus*- und *Anaplectus*-Spezies eine Verzögerung der Teilung der E-Zelllinie bzw. eine Entkoppelung der Teilungen der E-Zelllinie von der MS-Linie statt (Tabelle 3). Bei *C. elegans* hingegen teilt sich die E-Zelle bereits im 14-Zellstadium direkt im Anschluß an die Teilung ihrer Schwesterzelle MS von einer nach zwei Zellen (Tabelle 1).

7.7.3 Spezifität der Gastrulation mit einer E-Zelle

Um zu überprüfen, ob sich die Gastrulation mit einer E-Zelle auf *Plectus*- und *Anaplectus*-Spezies beschränkt oder ein Charakteristikum aller Plectiden ist, wurden mit *E. arcticum* und *Tylocephalus auriculatus* zwei weitere Plectiden untersucht.

Mit *Teratocephalus lirellus* wurde außerdem der nächste Verwandte zu den beiden bei Blaxter *et al.* (1998) aufgeführten *Plectus*-Spezies (*P. aquatilis* und *P. acuminatus*) untersucht (Abbildung 4.1).

Bei dem Plectiden *T. auriculatus* beginnt die Gastrulation schon im 8-Zellstadium und damit zu einem für *Plectus*- und *Anaplectus*-Spezies typischen frühen Zeitpunkt. Es tritt jedoch keine Verzögerung der Teilung der E-Zelle von einer nach zwei Zellen auf. Ähnlich *C. elegans* teilt sich die E-Linie zu einem für Plectiden untypisch frühen Zeitpunkt im 16-Zellstadium direkt nach der MS-Linie.

<i>Tylocephalus auriculatus</i>	
Zelle in Teilung	Zellstadium
P ₀	2
¹ AB ²	3
P ₁	4
² AB ⁴	6
P ₂	7
EMS	8
⁴ AB ⁸	12
¹ C ²	13
P ₃	14
¹ MS ²	15
¹ E ²	16
⁸ AB ¹⁶	24
² C ⁴	26
² MS ⁴	28
¹⁶ AB ³²	44
² E ⁴	46
⁴ MS ⁸	50

Tabelle 6: Zellteilungssequenz von *Tylocephalus auriculatus*, modifiziert in Lahl *et al.*, 2003. Grau unterlegtes Feld markiert den Beginn der Gastrulation.

Hinsichtlich der räumlichen Anordnung der Blastomeren und der Symmetriebildung zeigt *T. auriculatus* aber wiederum ein für Plectiden sehr typisches Muster.

Sowohl *E. arcticum* als auch *T. auriculatus* zeigen eine für Plectiden typische Gastrulation mit einer E-Zelle zu einem frühen Zeitpunkt.

Bei *T. lirellus* tritt zwar die für Plectiden typische Verzögerung der Teilung der E-Linie (Tabelle 4) auf. Trotz seiner verwandtschaftlichen Nähe zu den Plectiden gastruliert *T. lirellus* jedoch erst nach dem 24-Zellstadium mit 2 E-Zellen und ähnelt in dieser Hinsicht *C. elegans* weit mehr als den Plectiden (Tabelle 3).

Obwohl also einige Charakteristika für Plectiden auch außerhalb der Genera *Plectus* und *Anaplectus* nachgewiesen werden konnten, ist die frühe Gastrulation mit nur einer Darmvorläuferzelle eng auf eine kleine Gruppe von Nematoden beschränkt, zu der *T. lirellus* trotz naher Verwandtschaft nicht gehört.

7.7.4 Induzierte Gastrulation mit einer E-Zelle bei *C. elegans*

Vergleicht man bei *C. elegans* (Tabelle 1) und den *Plectus*-/*Anaplectus*-Spezies (Tabelle 3) den Zeitpunkt der ersten Teilung von MS und E, fällt auf, dass sich bei *C. elegans* diese beiden Zellen direkt nacheinander teilen.

Bei den *Plectus*-/*Anaplectus*-Spezies dagegen findet die erste Teilung von MS und E nicht direkt nacheinander statt, sondern die E-Zelle setzt eine Runde aus. Genau in diesen Zeitraum fällt die Immigration der Darmvorläuferzelle. Erst mit der nächsten Teilung von 1E

nach 2E nimmt die E-Zelle ihre Mitoseaktivität wieder auf und teilt sich fortan direkt vor der Schwesternlinie MS (Kapitel 7.7.2 und 7.7.3). Offenbar besitzt schon die E-Zelle der *Plectus*- und *Anaplectus*-Spezies die Kompetenz zur Immigration, wohingegen bei *C. elegans* zumindest unter natürlichen Bedingungen erst eine Teilung in zwei E-Zellen erfolgt sein muss, bevor die Gastrulation beginnt.

Durch das folgende Experiment soll geklärt werden, ob diese Teilung in zwei E-Zellen für *C. elegans* ein notwendiger Bestandteil der normalen Gastrulation ist oder ob auch eine Gastrulation ohne vorangegangene Teilung der E-Zelle möglich ist.

Die E-Zelle wird kurz nach ihrer Entstehung wie bei einer Ablation einem Laserstrahl ausgesetzt (n=18). Um jedoch nur eine subletale Schädigung herbeizuführen, wird hier mit geringeren Dosen und längeren Pausen gearbeitet. Ziel ist es, die Schädigung der Nachbarzellen durch Überhitzung möglichst gering zu halten und nur die Mitoseaktivität der E-Zelle zu behindern. Nach der Laserbestrahlung wird die weitere Entwicklung bis zum Ende der Einwanderung beobachtet und anschließend gewartet bis der terminale Phänotyp entstanden ist.

Abbildung 7.32 zeigt mit (a) und (b) die normale Gastrulation mit zwei sich ins Zentrum verlagernden E-Zellen bei *C. elegans* und mit (c) bis (f) die Gastrulation nach subletaler Schädigung der E-Zelle.

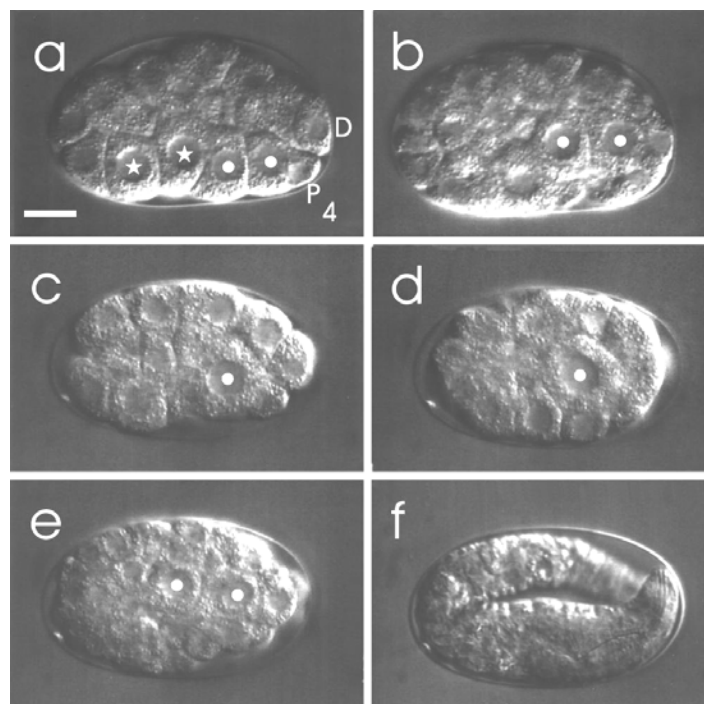


Abbildung 7.32: Gastrulation bei *C. elegans*, Lahl *et al.*, 2003. (a)+(b) normale Gastrulation mit 2E-Zellen im unbehandelten Tier, (c) bis (f) Entwicklung nach Laserbeschuss, (c)+(d) laserinduzierte Gastrulation mit einer ungeteilten E-Zelle, (e) E-Zelle hat sich im Zentrum geteilt, (f) sich bewegendende Larve. * MS-Zelle, o E-Zelle. Orientierung anterior=links, Nomarski-optik. Eichstrich: 10µm

In allen Fällen der E-Zellbestrahlung beginnt die Gastrulation zunächst mit einer Zelle (18/18) (Abbildung 7.32 c, d). Je nach Stärke der subletalen Schädigung teilt sich die Darmvorläuferzelle entweder auf ihrem Weg ins Zentrum (9/18) oder erst, nachdem sie ihre endgültige Lage in der Mitte des Embryos erreicht hat (9/18) (Abbildung 7.32 d+e).

Von den Embryonen, bei denen die Immigration vollständig mit einer E-Zelle abgelaufen und erst anschließend eine Teilung in zwei Zellen erfolgt ist (9/18), entwickeln sich vier Embryonen (4/9) zu sich bewegend Larven. Drei von diesen (3/4) weisen wahrscheinlich in Folge leichter Schädigung der C-Zelle geringe Kutikulaschäden auf, wohingegen die vierte Larve (1/4) normal entwickelt erscheint (Abbildung 7.32 f). Bei den übrigen fünf Embryonen (5/9) arretiert die Entwicklung im Pflaumenstadium.

In allen neun Fällen, in denen die Einwanderung der Darmvorläuferzelle vollständig nach einem für *Plectus*- und *Anaplectus*-Spezies typischen Muster erfolgt ist, hat sich die E-Zelle abweichend vom normalen Rhythmus erst nach der Teilung von 8 nach 16 AB-Zellen geteilt.

Die Experimente zeigen, dass mittels Laserbestrahlung der E-Zelle und damit verbundener Verzögerung des Zellzykluses Embryonen von *C. elegans* dazu gebracht werden können, eine ansonsten für *Plectus*/*Anaplectus*-Spezies typische Gastrulation mit nur einer E-Zelle durchzuführen. Die bei *C. elegans* unter normalen Bedingungen der Gastrulation vorausgehende Teilung der Darmvorläuferzelle in zwei Zellen ist somit nicht nötig, um die Fähigkeit zur Einwanderung zu erlangen. Eine normale Entwicklung ist also auch bei *C. elegans* nach bestimmten Abweichungen in der Teilungssequenz der Zellen noch möglich und die normalerweise beobachtete Invarianz in diesem Aspekt nicht zwingend nötig.

7.7.5 Darmzellendifferenzierung bei *D. coronatus* und „P. mekong“

7.7.5.1 Akkumulation von Acridinorange

Überschichtet man eine Platte mit Würmern von *D. coronatus* mit Acridinorange, nehmen die Tiere den fluoreszierenden Farbstoff zusammen mit den Bakterien auf und transportieren ihn zusammen mit Granula aus dem Darm über den Gonadenschlauch in die Oocyten.

Zunächst leuchten junge Embryonalstadien von so behandelten Adulten in ihrer Gesamtheit. Mit fortschreitender Entwicklung verschwindet Acridinorange aber zunehmend aus den anderen Zellen und wird in den E-Zellen angehäuft. Ab dem 8 E-Zellstadium beginnt dann die Darmanlage zu leuchten, während die Fluoreszenz in den anderen Zellen deutlich abnimmt und schließlich fast ganz verschwindet.

Auch bei Oocyten von „P. mekong“ wird Acridinorange zusammen mit Granula von den sich differenzierenden Darmzellen in der zweiten Hälfte der Embryogenese aus den umgebenden Zellen endozytiert und in frühen Morphogenesestadien als Leuchten sichtbar (Abbildung 7.42 aA bis cC). Die Akkumulation von Acridinorange kann als Nachweis für sich differenzierende Darmzellen bzw. für eine stattgefundene Zellschicksalstransformation nach Ablation von EMS dienen (*A. nanus*).

7.7.5.2 Nachweisversuch der IVC mit dem Antikörper ICB4

Bei *D. coronatus* setzt sich die intestinal-rektale Klappe, die Darm und Rektum verbindet, anders als bei *C. elegans* aus vier IVC zusammen. Abbildung 7.33 zeigt ein mit dem Antikörper ICB4 behandeltes Kaulquappenstadiums von *D. coronatus*. Wie bei *C. elegans* werden Darmanlage und IVC angefärbt. Die IVC sind jeweils mit einem Dreieck gekennzeichnet.

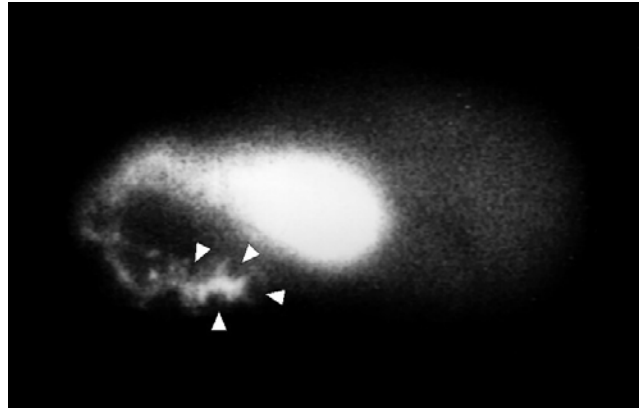


Abbildung 7.33: Antikörperfärbung eines Kaulquappenstadiums von *D. coronatus* mit ICB4. Markiert sind die Darmanlage und die vier IVC (weiße Dreiecke).

Bei „*P. mekong*“ hingegen konnten keine IVC erkannt werden, was jedoch an mangelnder Kreuzreaktion mit dem Antikörper liegen könnte.

7.8 Vergleich der bilateralen Symmetriebildung bei *C. elegans* und einigen parthenogenetischen Spezies

7.8.1 Ausbildung der bilateralen Symmetrie in den Zelllinien von *C. elegans*

Um einen Ausgangspunkt für einen späteren Vergleich mit anderen Nematoden zu haben, wurde die bereits bekannte Ausbildung der bilateralen Symmetrie bei *C. elegans* (Schierenberg, 1978) anhand von im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Computerrekonstruktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryogenese nachvollzogen (Abbildung 7.34).

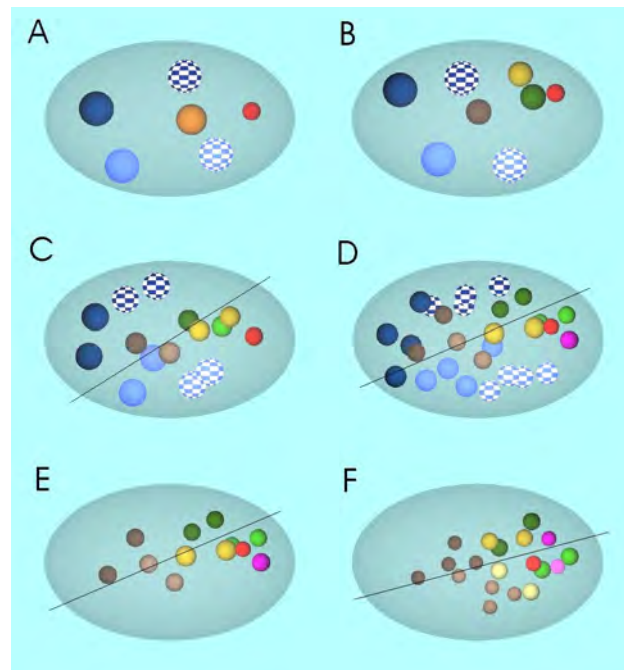


Abbildung 7.34: Etablierung der bilateralen Symmetrie in frühen Stadien von *C. elegans*. Computergestützte Rekonstruktionen, Lahl *et al.*, 2003. (A) 6-Zellstadium, (B) 8-Zellstadium, (C) 15-Zellstadium, (D) 28-Zellstadium, (E) 44-Zellstadium, (F) 51-Zellstadium, in (E) und (F) fehlen die AB-Zellen aus Gründen der Übersicht, bei den AB-Zellen deutet die unterschiedliche Schattierung nur auf die grundsätzliche Trennung in linke und rechte Anteile wie in Bild (A) hin. Schwarze Linien zeigen die Symmetrieachse an. Farbcodierung siehe Text. Orientierung: Ventralansicht, anterior=linke Bildseite

Bei *C. elegans* wird die bilaterale Symmetrie des Embryos durch Ausbildung von zueinander bilateral symmetrischen Strukturen innerhalb der jeweiligen Zelllinien erreicht (von Ehrenstein & Schierenberg, 1980; Sulston *et al.*, 1983). Entweder mit der ersten Teilung (Zelle MS = Bild C, Zelle C = Bild C, Zelle D = Bild F), doch spätestens mit der zweiten Teilung (Zelle E = Bild F und Zelle AB = Bild A) entstehen somatische Tochterzellen, die jeweils die spätere rechte bzw. linke Seite begründen.

Da die entsprechenden Teilungen jedoch zu diesem Zeitpunkt noch mit einer vorherrschend anterior-posterioren Spindelausrichtung (MS, C) erfolgen bzw. in der AB-Zelllinie rechte und linke Anteile gegeneinander verschoben sind, wird die frühe bilaterale Aufspaltung der Zelllinien nicht sofort deutlich. So stellt die anterior-posteriore Teilungsrichtung der ersten Teilung von MS und C trotzdem eine rechts-links-Entscheidung dar. Die Abkömmlinge der jeweils anterioren Zelle bilden die gesamten linken Strukturen in dieser Zelllinie, die Nachkommen der jeweils posterioren bilden die rechten. Erst durch weitere Zellteilungen und Verschiebungen nähern sich die Zellen zunehmend ihrer endgültigen rechten und linken Position im Embryo an (Schierenberg *et al.*, 1984). Dies wird durch eine schrittweise stattfindende anterior-posteriore Ausrichtung der Symmetrieachse besonders in der MS- (braun) und C-Zelllinie (grün) deutlich.

Mit der zweiten Teilung von MS und C wird dann eine funktionelle Entscheidung getroffen. Aus den beiden vorderen MS-Zellen entsteht im wesentlichen Pharynx, die beiden hinteren tragen vorwiegend zur Körpermuskulatur bei. Bei den C-Zellen wird aus den vorderen Nachkommen ausschließlich Ektoderm, die hinteren sind Körpermuskelvorläufer.

Bei der E-Zelllinie wird mit der ersten Teilung die Entscheidung zwischen Vorder- und Hinterdarm getroffen. Unklar ist, ob dies mit einer funktionellen Entscheidung einhergeht. Erst mit der nächsten Teilung werden rechte und linke Anteile etabliert.

In der AB-Linie bestehen einige Besonderheiten hinsichtlich einer bilateralen Symmetriebildung. Obwohl sich die ersten beiden AB-Zellen ABa und ABp zunächst mit einer strikt transversen Ausrichtung der Spindel in jeweils linke und rechte Tochterzellen teilen, verschieben sich kurz darauf die jeweils linken Nachkommen relativ zu den rechten Töchtern nach anterior (Schierenberg *et al.*, 1984) (Abbildung 7.34 C + D). Diese frühe Asymmetrie setzt sich über die gesamte weitere Embryogenese fort und wird vor allem in Abbildung 7.34 D deutlich, bei der der anteriore Bereich des Embryos vollständig von Nachkommen der ABal gebildet wird und auch die linken Zellen der AB-Linie gegenüber den rechten Zellen insgesamt nach anterior verschoben sind. Symbolisiert wird dies auch durch eine fehlende anterior-posteriore Ausrichtung der Symmetrieachse innerhalb dieser Linie.

Die Nachkommen der AB-Linie der linken Seite folgen also nicht genau demselben Muster wie die der rechten Seite, sondern bilden auch untereinander bilateral symmetrische Strukturen aus (Sulston *et al.*, 1983). Zum Beispiel wird das Gewebe im anterioren Bereich des Wurmes, obwohl es symmetrisch ist, ausschließlich von Nachkommen der ABal gebildet.

Die AB-Linie ist somit die einzige Zelllinie bei *C. elegans*, bei der zueinander symmetrische Strukturen nicht ausschließlich aus einer oder zwei rechten und linken Ursprungszellen hervorgehen, sondern in der sich auch Symmetrien innerhalb einzelner Stammbaumzweige ausbilden.

7.8.2 Ausbildung der bilateralen Symmetrie in den Zelllinien von *D. coronatus* und *A. nanus*

Abbildung 7.35 und Abbildung 7.36 zeigen die Ausbildung der bilateralen Symmetrie bei *D. coronatus* und *A. nanus*. Ähnlich *C. elegans* wird auch bei diesen beiden Spezies die bilaterale Symmetrie nur schrittweise etabliert. Die somatischen Zellen begründen zwar bereits mit ihrer ersten (C, MS, D) oder zweiten Teilung (AB, E) spätere rechte und linke Anteile des Embryos. Bei den meisten Zelllinien wird dies jedoch durch einen deutlich anterior-posterioren Faktor in der Teilungsrichtung verschleiert. Auf diese Weise kommen die jeweiligen Zellen, die später rechte und linke Gewebe einer jeden Zelllinie begründen, nicht in rechts-links Anordnung (entspricht in den Abbildungen aufgrund der Ventralansicht oben und unten) zueinander zu liegen, sondern haben zunächst eine mehr oder weniger schräge Ausrichtung (Abbildung 7.35 c, Abbildung 7.36 D), wobei der linke Anteil etwas mehr anterior liegt als der rechte.

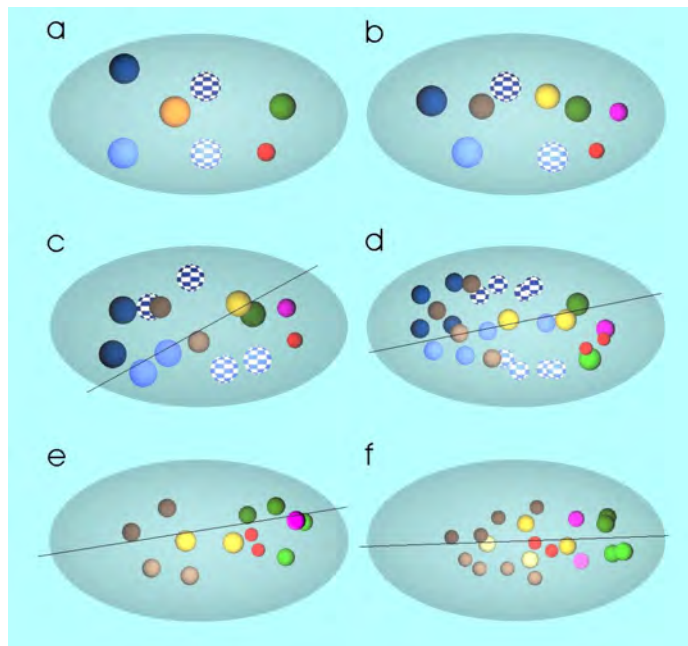


Abbildung 7.35: Etablierung der bilateralen Symmetrie in frühen Stadien von *D. coronatus*. Computergestützte Rekonstruktionen. (a) 7-Zellstadium, (b) 9-Zellstadium, (c) 14-Zellstadium, (d) 27-Zellstadium, (e) 45-Zellstadium, (f) 52-Zellstadium, in (e) und (f) fehlen die AB-Zellen aus Gründen der Übersicht, bei den AB-Zellen deutet die unterschiedliche Schattierung nur auf die grundsätzliche Trennung in linke und rechte Anteile wie in Bild (a) hin. Schwarze Linien zeigen die Symmetrieachse an. Farbcodierung siehe Text. Orientierung: Ventralansicht, anterior=linke Bildseite

Durch weitere Beobachtungen wird deutlich, dass die Nachkommen dieser Zellen erst während weiterer Zellteilungen und –wanderungen zunehmend den jeweils linken und rechten Bereich im Embryo ausfüllen (Abbildung 7.35 d, e). Symbolisiert wird dies durch die zunehmende anterior-posteriore Ausrichtung der über alle Zelllinien gemittelten bilateralen Symmetrieachse. Steht sie in den frühen Stadien noch sehr schräg, nimmt sie mit fortschreitender Entwicklung eine mehr und mehr waagerechte d.h. anterior-posteriore Lage ein. Eine Ausnahme hiervon sind die D-Linie und die C-Linie, die sich schon mit ihrer ersten Teilung annähernd bilateral symmetrisch verhalten.

Ermittelt man die Symmetrieachse in den verschiedenen Abbildungen für jede Zelllinie einzeln, fällt auf, dass bei *D. coronatus* die Ausbildung der rechts-links Symmetrie in der MS- und C-Linie am schnellsten abgeschlossen ist. Die Keimbahnzelle P_4 teilt sich bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt und stellt somit eine Ausnahme dar (Abbildung 7.35 d).

Bei *A. nanus* (Abbildung 7.36) teilt sich hingegen die C-Zelle direkt in eine rechte und linke Tochterzelle Cr und Cl, während MS sich wie bei *C. elegans* und *D. coronatus* verhält und zunächst mit eher anterior-posteriorer Spindelausrichtung teilt.

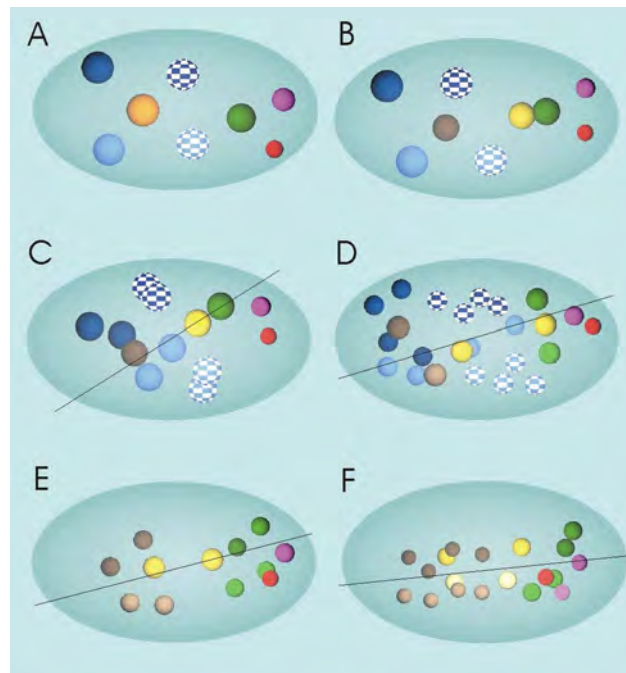


Abbildung 7.36: Etablierung der bilateralen Symmetrie in frühen Stadien von *A. nanus*.

Computergestützte Rekonstruktionen. (A) 8-Zellstadium, (B) 9-Zellstadium, (C) 13-Zellstadium, (D) 24-Zellstadium, (E) 44-Zellstadium, (F) 51-Zellstadium, in (E) und (F) fehlen die AB-Zellen aus Gründen der Übersicht, bei den AB-Zellen deutet die unterschiedliche Schattierung nur auf die grundsätzliche Trennung in linke und rechte Anteile wie in Bild (A) hin. Schwarze Linien zeigen die Symmetrieachse an. Farbcodierung siehe Text. Orientierung: Ventralansicht, anterior=linke Bildseite

Während sich bei beiden Spezies die Nachkommen der beiden E-Zellen Ea und Ep in der weiteren Embryogenese noch bilateral zueinander ausrichten, so folgt die Anordnung innerhalb der AB-Linie sowohl bei *D. coronatus* als auch bei *A. nanus* einem anderen Muster. Obwohl sowohl die Nachkommen der anterioren (ausgefüllt) als auch die der posterioren (kariert) AB-Zelle zunächst nur einen leichten Schrägfaktor aufweisen und die Symmetrie innerhalb dieser Linie bald erreicht zu sein scheint, zeigen ihre weiteren Nachkommen eine zunehmende Auflösung dieser Anordnung (Abbildung 7.35 a gegenüber b, c, d und Abbildung 7.36 A gegenüber B, C, D).

Anders als bei allen anderen Zelllinien bilden hier nicht Nachkommen der jeweils ersten rechten und linken Zelle gemeinsam eine Gewebestruktur, sondern der anteriore Bereich wird komplett von Nachkommen der ABal ausgefüllt (Abbildung 7.35 c, d). Faktisch sind also die AB-Zellen in diesem Bereich des Embryos zu sich selbst symmetrisch. Es existiert für einen bestimmten Nachkommen der ABal keine Entsprechung aus der Linie ABar.

Die AB-Linie ist somit die einzige Zelllinie, bei der die Symmetrieachse zunehmend steiler wird anstatt sich waagerecht auszurichten. Soweit man die Embryogenese verfolgen kann, ändert sich diese spezielle Anordnung innerhalb der AB-Linie auch in der weiteren Entwicklung nicht.

Die bereits an anderer Stelle angesprochene Variabilität hinsichtlich der räumlichen Musterbildung innerhalb der Zellgruppe EMS, C, P₃ bzw. D, P₄ bei *D. coronatus* und *A. nanus* nimmt keinen Einfluß auf die Symmetriebildung. Abweichungen zwischen Vertretern der einzelnen Varianten treten nicht auf.

Vergleicht man die Ausbildung der bilateralen Symmetrie von *D. coronatus* und *A. nanus* mit der von *C. elegans*, treten, abgesehen von der unterschiedlichen Zellteilungsreihenfolge, die auch in den Abbildungen zum Ausdruck kommt, nur marginale Unterschiede auf. Selbst die zunächst überraschende Symmetriebildung innerhalb der AB-Zelllinie von *D. coronatus* findet sich auch bei *C. elegans* wieder (Schierenberg *et al.*, 1984, Sulston *et al.*, 1983). Insgesamt scheint die Etablierung der rechts-links Symmetrie jedoch bei *D. coronatus* (Abbildung 7.35) etwas schneller abgeschlossen zu sein als bei *C. elegans* (Abbildung 7.34).

Um sicher beurteilen zu können, welcher Bereich zukünftig von welchen Zellen eingenommen wird, müsste man die gesamte Embryogenese Zelle für Zelle analysieren. Leider ist dies aufgrund der mangelnden Transparenz nicht möglich. Immerhin lassen sich jedoch die Blastomeren aller hier untersuchten Spezies so weit verfolgen, dass grundlegende Zellverschiebungen, die zu einer Umstrukturierung der rechten und linken Anteile führen könnten, sehr unwahrscheinlich erscheinen.

7.8.3 Ausbildung der bilateralen Symmetrie in den Zelllinien von „P. mekong“

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Spezies treten bei der Ausbildung der bilateralen Symmetrie von „P. mekong“ deutliche Unterschiede zu den zuvor untersuchten Nematoden auf. Abbildung 7.37 zeigt die Ausbildung der bilateralen Symmetrie bei „P. mekong“.

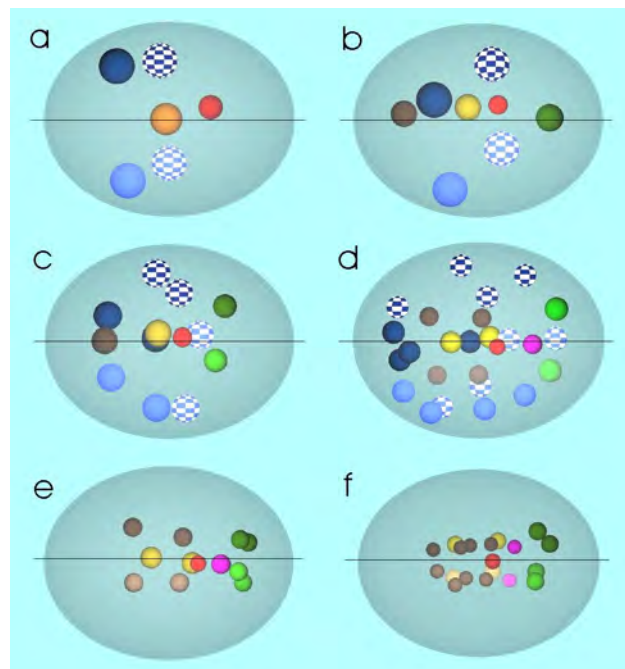


Abbildung 7.37: Etablierung der bilateralen Symmetrie in frühen Stadien von „Plectus mekong“. Computergestützte Rekonstruktionen, Lahl *et al.*, 2003. (a) 6-Zellstadium, (b) 8-Zellstadium, (c) 13-Zellstadium, (d) 26-Zellstadium, (e) 44-Zellstadium, (f) 51-Zellstadium, in (e) und (f) fehlen die AB-Zellen aus

Gründen der Übersicht, bei den AB-Zellen deutet die unterschiedliche Schattierung nur auf die grundsätzliche Trennung in linke und rechte Anteile wie in Bild (a) hin. Schwarze Linien zeigen die Symmetrieachse an. Farbcodierung siehe Text. Orientierung: Ventralansicht, anterior=linke Bildseite

Statt einer Teilung wie bei *C. elegans*, die zwar rechte und linke Nachkommen voneinander trennt, aber zunächst einen deutlichen Schrägfaktor aufweist, vollziehen hier alle Zelllinien schon die erste Teilung in strikter rechts-links Richtung, so dass die frühe bilaterale Aufspaltung der Zelllinien sofort deutlich wird. Auf diese Weise haben rechte und linke Nachkommen im Groben von Geburt an die richtige Position im jeweils rechten und linken Teil des Embryos und müssen keine gravierenden Zellwanderungen vollziehen, um bilateral symmetrische Strukturen zu etablieren.

Die Ausrichtung der über alle Zelllinien gemittelten bilateralen Symmetrieachse macht dies deutlich: Sie ist von Beginn an und über den gesamten Untersuchungszeitraum in anterior-posterior Richtung orientiert und symbolisiert so die mit der Geburt einhergehende Positionierung der rechten und linken Anteile. Ermittelt man die Symmetrieachse in den verschiedenen Abbildungen für jede Zelllinie einzeln, wird auch hier deren longitudinale Ausrichtung deutlich.

Anders als bei *C. elegans*, *A. nanus* und *D. coronatus* liegen die linken AB-Zellen zu keinem Zeitpunkt weiter anterior als die rechten AB-Zellen. Die weitere Ausbildung der bilateralen Symmetrie innerhalb der AB-Zelllinie weist einige Besonderheiten auf und wird aufgrund ihrer Komplexität in anderen Kapiteln gesondert behandelt.

Die frühe und unmittelbare Art der Etablierung der bilateralen Symmetrie ist allen untersuchten Vertretern der *Plectus*- und *Anaplectus*-Spezies sowie *E. arcticum* und *T. auriculatus* gemeinsam.

Bei *T. lirellus* als nahem Verwandten hingegen teilen sich die Blastomeren wie bei *C. elegans*, *A. nanus* und *D. coronatus* zunächst in anterior-posteriorer Richtung und die bilaterale Symmetrie wird erst nach und nach erreicht. Untersuchungen an *Ascaris* sp., Vertreter von Clade III ergaben hingegen eine ähnlich frühe bilaterale Symmetriebildung wie bei Plectidae (zur Strassen, 1896; Boveri, 1899).

Die frühe Etablierung der rechts-links-Symmetrie beschränkt sich also anders als die Gastrulation mit einer E-Zelle nicht auf Plectiden.

7.8.3.1 Durchmischung von ABa- und ABp-Nachkommen im 8-Zellstadium

Wie schon zuvor beschrieben, teilen sich bei *C. elegans* die ersten beiden AB-Zellen (ABa und ABp) mit einer strikt transvers orientierten Spindel. Direkt nach der Teilung verschiebt sich jedoch das linke Paar (ABal und ABpl) relativ zum rechten Paar (ABar und ABpr) nach anterior (Schierenberg *et al.*, 1984). Auf diese Weise entsteht eine frühe Asymmetrie innerhalb der AB-Linie, die während der gesamten weiteren Embryogenese bestehen bleibt (Sulston *et al.*, 1983).

Bei Plectiden fehlt diese frühe Verschiebung innerhalb der AB-Linie. Die Orientierung der Teilungsspindel von ABa und ABp ist transvers. Aufgrund der Geräumigkeit innerhalb der Schale können sich die Tochterzellen rechts-links zueinander anordnen, so dass schon sehr früh eine bilaterale Symmetrie deutlich wird.

Im 6-Zellstadium liegen die rechten und linken Nachkommen von ABa und ABp jeweils auf der rechten und linken Seite des Embryos. Es existiert also eine Fokusebene mit ABal und ABpl und eine zweite Ebene mit ABar und ABpr, so dass die Vermutung nahe liegt, dass bei dieser Zelllinie im Unterschied zu *C. elegans* und wahrscheinlich auch zu *D. coronatus* die Ausbildung der bilateralen Symmetrie auf ähnliche Weise abläuft wie bei den übrigen Zelllinien (Kapitel 7.8.3).

Im Zuge der Entwicklung zum 8-Zellstadium, die durch Teilung der P₂ und der EMS charakterisiert ist, dreht sich der Embryo aus der Laterallage so, dass die Ventralseite zum Betrachter zeigt. Neben dieser Drehung des gesamten Embryos vollzieht sich jedoch ebenfalls zu diesem Zeitpunkt eine wichtige Veränderung in der Anordnung der Blastomeren zueinander, die zu einer Durchmischung der rechten und linken AB-Zellen führt.

Abbildung 7.38 veranschaulicht die Rotation des Embryos und die Aufspaltung der rechten und linken AB-Zellen. Vormalig mit ABar in einer Ebene, befindet sich ABpr im frühen 8-Zellstadium mit den beiden linken AB-Zellen ABal und ABpl in einer Ebene (Abbildung 7.38 a). Ein paar Minuten später beginnt ABpl am linken Rand des Embryos in eine ventrale Ebene aufzusteigen (Abbildung 7.38 b). Die Rotationsbewegungen unterstützen diesen Vorgang.

In Abbildung 7.38 c ist die Rotation abgeschlossen. ABar und ABpl bilden die Seiten des Embryos und erscheinen symmetrisch zueinander. Anterior liegt MS, posterior C. In der Tiefe, d.h. dorsal von ihnen, verbleiben anterior die ABal und posterior die ABpr (a). Eine Durchmischung der anterioren und posterioren AB-Zellen hat stattgefunden.

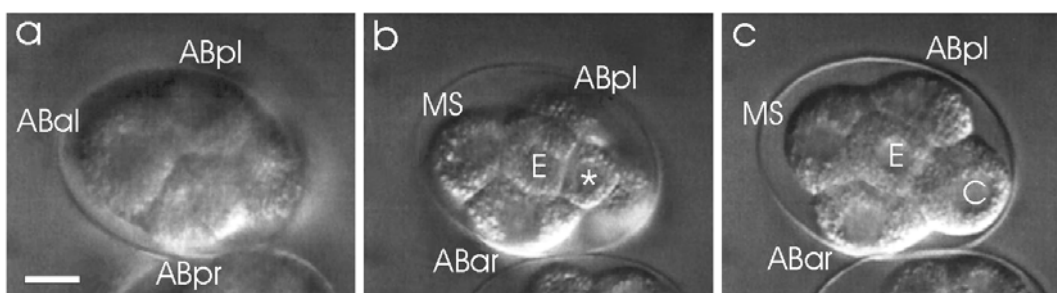


Abbildung 7.38: Ausbildung der bilateralen Symmetrie bei „Plectus mekong“. (a) 8-Zellstadium, tiefe Ebene ABal, ABpl und ABpr in einer Ebene, (b) 8-Zellstadium, am linken Rand steigt die zuvor rückwärtig gelegene ABpl auf, * P₃ (c) späteres 8-Zellstadium, zentrale Fokusebene, ABpl bildet den linken Rand, ABar bildet den rechten Rand. Ventralansicht. Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

Im Folgenden teilen sich alle vier AB-Zellen. Die die Seiten des Embryos bildenden Zellen ABar und ABpl teilen sich in anterior-posterior Richtung und bringen die Töchter ABara,

ABarp, ABpla und ABplp hervor. Die beiden anderen ABal und ABpr teilen sich hingegen in die rechten und linken Nachkommen ABall, ABalr, ABprl und ABprl.

Wegen der mangelnden Transparenz des Embryos können die AB-Zellen leider in ihrer Gesamtheit nicht über das 32-AB-Zellstadium hinaus verfolgt werden. Aus diesem Grund beschränken sich die darüber hinausgehenden Untersuchungen auf die dem Betrachter zugewandten Zellen im anterior-ventralen Teil und die beiden lateralen Bereiche des Embryos.

7.8.3.2 Herkunft und Symmetriebildung der AB-Zellen im anterior-ventralen Bereich

Die Bildung des anterior-ventralen Bereich des Embryos lässt sich im Wesentlichen auf eine bestimmte Gruppe von Nachkommen der ABal zurückführen. Jeweils eine einzelne Nachkommenzelle nimmt dabei nach ihrer Entstehung den anterior-ventralen Bereich ein, ohne Symmetrien zu anderen Zellen zu bilden. Erst in höherzelligen Stadien sind einige ihre Nachkommen zueinander symmetrisch.

Abbildung 7.39 zeigt jeweils den anterioren Pol eines Embryos von „Plectus mekong“ zu unterschiedlichen Zeiten. Lag ABal noch auf der Dorsalseite des Embryos (Abbildung 7.38 a), ist ihre Tochter ABall auf dem Weg nach ventral zwischenzeitlich symmetrisch zu ABara in der zentralen Fokusebene (Abbildung 7.39 a). Ungefähr 30 min später ist ABall in die ventralste Schicht aufgestiegen und hat eine Position anterior der beiden MS-Zellen eingenommen. ABall ist zu diesem Zeitpunkt die am weitesten anterior gelegene Zelle (Abbildung 7.39 b).

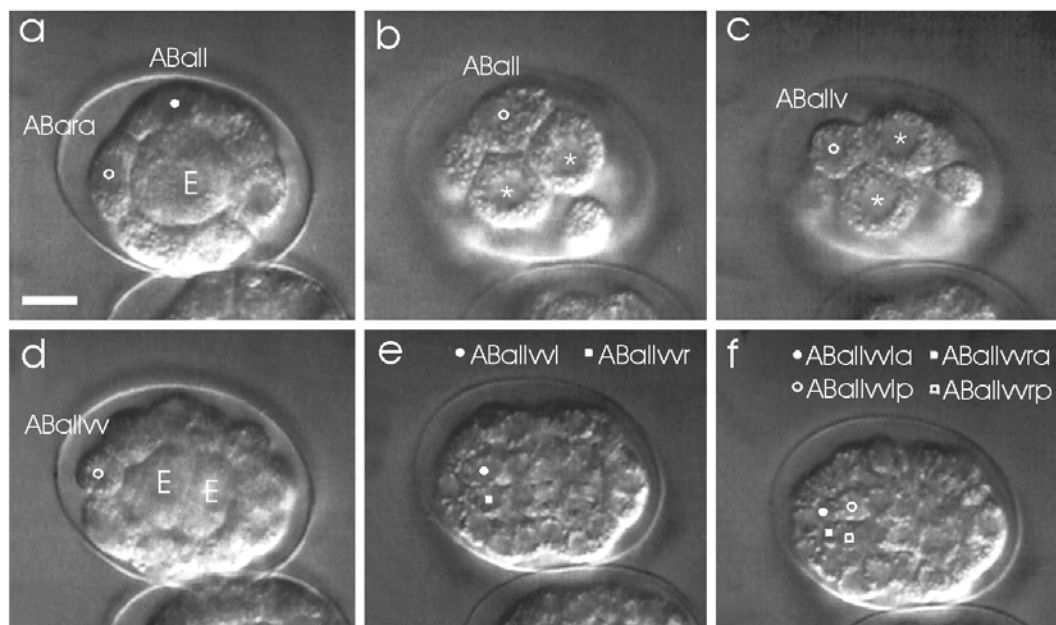


Abbildung 7.39: Symmetriebildung und Herkunft der AB-Zellen im anterior-ventralen Bereich von „Plectus mekong“. (a) frühes 8 AB-Zellstadium, zentrale Fokusebene, (b) späteres 8 AB-Zellstadium, Ventralansicht, (c) 16 AB-Zellstadium, Ventralansicht, (d) 32 AB-Zellstadium, zentrale Fokusebene, (e) 64 AB-

Zellstadium, Aufspaltung in rechte und linke Anteile im Embryo, Nahtbildung, Ventralansicht, (f) 128 AB-Zellstadium, Ventralansicht. Nomarskioptik.

Eichstrich: 10µm

ABara behält ihre Position zunächst bei. Auf die Positionen ihrer Nachkommen wird im Kapitel 7.8.3.3 genauer eingegangen.

Die nächste Teilung von ABall erfolgt in dorsal-ventraler Richtung, also in die Tiefe des Embryos und begründet die beiden Nachkommen ABallv und ABalld. Die Tochterzelle ABallv nimmt dieselbe Lage anterior der beiden MS-Zellen ein wie zuvor ihre Mutterzelle ABall (Abbildung 7.39 c). Die Schwesternzelle ABalld liegt dorsal davon. Die Symmetrieachse des Embryos teilt die beiden MS-Zellen in eine linke und rechte Zelle. ABallv liegt auf dieser Achse. Die folgende Teilung der ABallv vollzieht sich wieder in dorsal-ventraler Richtung, so dass die Töchter ABallvv und ABallvd entstehen. Wiederum liegt ABallvv direkt auf der Symmetrieachse ventral ihrer Schwester ABallvd und ist am besten zu sehen (Abbildung 7.39 d). ABallvv ist die letzte Zelle, die linke und rechte Anteile im anterior-ventralen Bereich des Embryos in sich vereint.

Mit der Teilung der ABallvv in die rechte Tochterzelle ABallvvr und die linke Tochter ABallvvl entstehen die Gründerzellen für die jeweils rechten und linken AB-Zellanteile im anterioren Bereich. Deutlich ist ab diesem Zeitpunkt eine anterior-posterior verlaufende Naht bzw. eine Mittellinie zu erkennen, die auch während der nächsten Teilungen nicht mehr überschritten wird (Abbildung 7.39 e).

Die nächste noch nachvollziehbare Teilung von ABallvvr und ihrer Schwester ABallvvl erfolgt in anterior-posterior Richtung, so dass rechte und linke Nachkommen bilateral getrennt voneinander bleiben (Abbildung 7.39 f). Im Folgenden wandern die AB-Zellen von ihrer vormals anterioren Position zunehmend auf die Bauchseite des Embryos und schließen zusammen mit den ihnen von posterior entgegenkommenden C-Zellen die Lücke, die die einwandernden MS-Zellen hinterlassen haben. Zu diesem Zeitpunkt liegen insgesamt 128 AB-Zellen vor.

Zusammenfassung Symmetriebildung und Herkunft der AB-Zellen im anterior-ventralen Bereich von „P. mekong“

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei „P. mekong“ trotz zwei aufeinander folgender rechts-links Teilungen der ABa zumindest im anterior-ventralen Bereich des Embryos rechte und linke Anteile noch nicht getrennt werden. Erst mit der rechts-links Teilung von ABallvv im 32-AB-Zellstadium erfolgt die bilaterale Ausspaltung der AB-Linie. Sie ist die Mutterzelle der rechten und linken AB-Zellen im anterior-ventralen Bereich des Embryos.

Wie bei *C. elegans* sind auch bei „P. mekong“ zumindest im anterior-ventralen Bereich letztendlich Nachkommen der linken AB-Zellen zueinander symmetrisch.

7.8.3.3 Symmetriebildung der AB-Zellen in den lateralen Bereichen

7.8.3.3.1 Ausbildung der rechten Seite des Embryos

Der rechte ventrolaterale Bereich des Embryos wird ausschließlich von Nachkommen der ABar gebildet. Aus Gründen der Übersicht wird in Nachkommen der ABara und Nachkommen von ABarp unterteilt.

Nachkommen der ABara

Abbildung 7.40 veranschaulicht die Bildung des anterioren Teils der rechten Seite. Im 8-Zellstadium nimmt ABar die gesamte rechte Seite ein und ist symmetrisch zu der die linke Seite bildende ABpl. Anterior liegt MS, posterior C (Abbildung 7.40 a).

Mit der Teilung von 4 nach 8 AB-Zellen teilt sich ABar anterior-posterior mit leicht schräger Komponente in die anteriolaterale ABara und die posteriolaterale ABarp (Abbildung 7.40 b). ABarp ist symmetrisch zu ABpla auf der linken Seite (Abbildung 7.40 c).

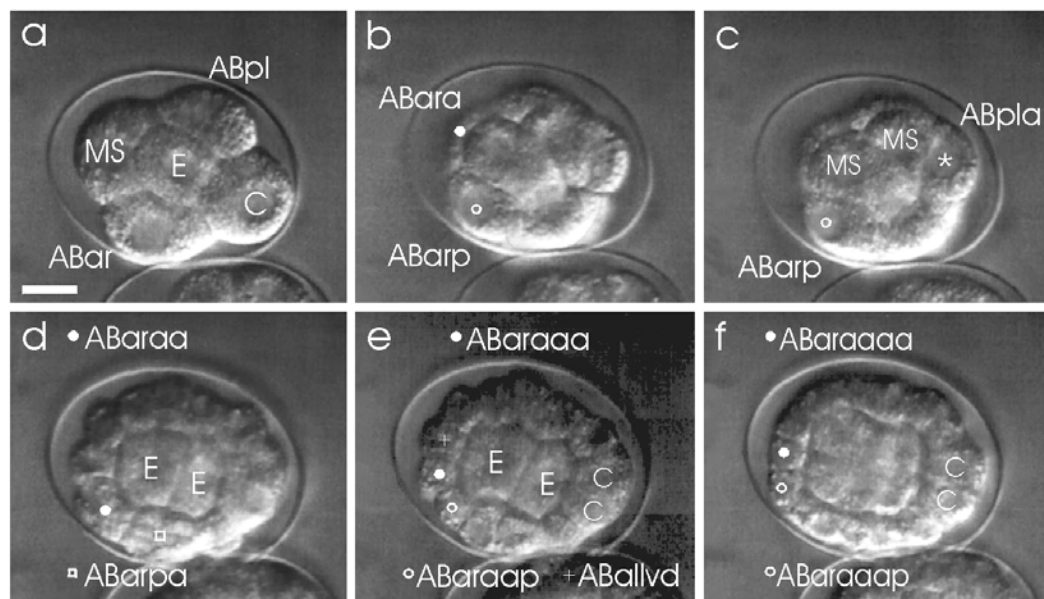


Abbildung 7.40: Bildung der rechten Seite bei „Plectus mekong“ durch Nachkommen von ABara. (a) 8-Zellstadium, (b) 14-Zellstadium, (c) 14-Zellstadium, ABarp und ABpla symmetrisch, (d) ca. 26-Zellstadium, (e) ca. 44-Zellstadium, (f) ca. 83-Zellstadium. (a, d-f) zentrale Fokusebene, (b+c) ventrale Fokusebene.

Ventralansicht, anterior=schräg links oben. Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

ABara befindet sich ein wenig dorsaler als ihre Schwester und bildet mit der neben ihr liegenden ABall vorübergehend symmetrische Strukturen im anterior-ventralen Bereich des Embryos (Abbildung 7.39 a). Im Folgenden teilt sich ABara anders als die den anterioren Bereich bildende ABall mit anterior-posteriorer Teilungsrichtung in die Zellen ABaraa (Abbildung 7.40 d) und ABarap. ABarap sinkt etwas in die Tiefe (dorsal) ab, so dass zum

Zeitpunkt der nächsten Teilung ABaraa posterior an die sich ebenfalls anterior-posterior teilende Cousinenzelle ABarpa grenzt (Abbildung 7.40 d).

ABaraa teilt sich wiederum mit anterior-posteriorer Teilungsrichtung in die Töchter ABaraaa und ABaraap (Abbildung 7.40 e). Nach ungefähr 1 h ist ABaraaa etwas nach dorsal abgesunken und grenzt anterior an ABallvd (Abbildung 7.40 e).

Auch die folgende Teilung der ABaraaa und ihrer Schwester ABaraap erfolgt in anterior-posterior Richtung. Die beiden Töchter der ABaraaa, ABaraaaa und ABaraaaap, sind noch gut zu erkennen und bilden den anteriolateralen Bereich des Embryos (Abbildung 7.40 f). Zu diesem Zeitpunkt liegen insgesamt 64 AB-Zellen vor.

Nachkommen der ABarp

Abbildung 7.41 zeigt die Bildung des posterioren Bereichs der rechten Seite und Symmetrien zu Zellen der linken Seite. Der posteriore Teil der rechten Seite Embryonen wird von Nachkommen der ABarp gebildet. Im 14-Zellstadium ist ABarp symmetrisch zu ABpla auf der linken Seite (Abbildung 7.41 a). ABarp nimmt dabei eine ventralere Position ein als ihre Schwester ABara.

Bei der Teilung von 8 in 16 AB-Zellen teilen sich sowohl ABpla auf der linken Seite anterior-posterior in die Töchter ABplaa und ABplap (Abbildung 7.41 b) als auch ABarp auf der rechten Seite anterior-posterior in die Töchter ABarpa und ABarpp (Abbildung 7.41 c). ABplaa ist symmetrisch zu ABarpa. ABplap ist symmetrisch zu ABarpp (Abbildung 7.41 d).

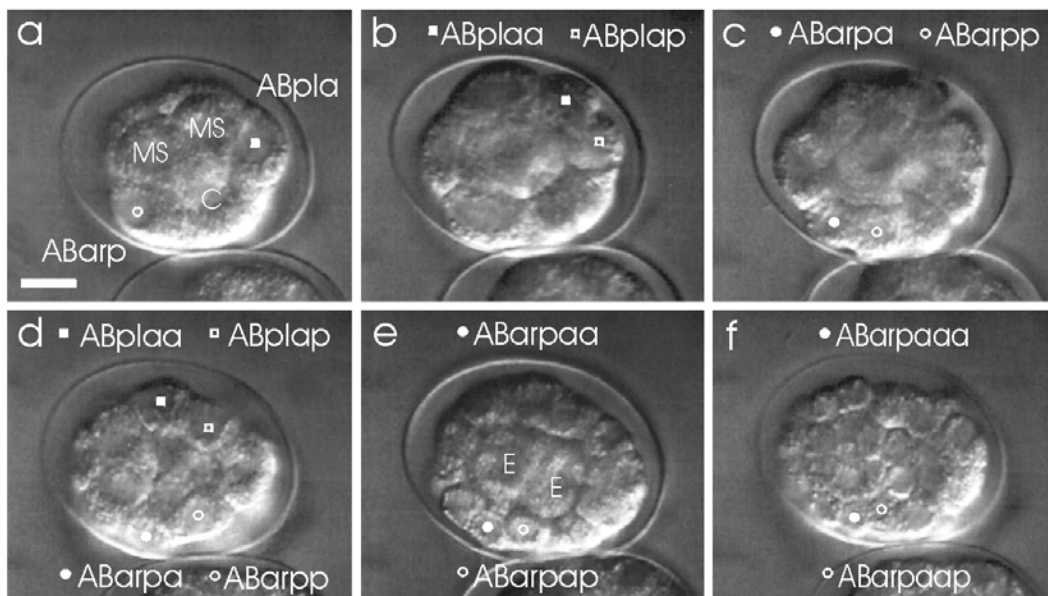


Abbildung 7.41: Bildung der linken Seite und Bildung der rechten Seite bei „Plectus mekong“ durch Nachkommen von ABarp. (a) 14-Zellstadium, (b) ca. 15-Zellstadium, Teilung von ABpla, (c) ca. 16-Zellstadium, (d) ca. 22-Zellstadium, Teilung von ABarp, (e) ca. 44-Zellstadium, (f) ca. 83-Zellstadium. Ventralansicht,

anterior=schräg links oben (a-c) bzw. links (d-f). Nomarskioptik. Eichstrich:
10µm

Auch die nächste Teilung der ABarpa vollzieht sich mit anterior-posteriorer Teilungsrichtung in die Tochterzellen ABarpaa und ABarpap (Abbildung 7.41 e). Die Teilung der weiter posterior gelegenen Schwesternzelle ABarpp erfolgt ebenfalls in anterior-posteriorer Richtung. Die Töchter werden jedoch wegen der sich teilenden C-Zellen etwas verschoben und sind so nicht gleichzeitig darstellbar.

Die letzte noch beurteilbare Teilung der anterioren Tochter ABarpaa verläuft ebenfalls in anterior-posterior Richtung, so dass die Töchter ABarpaaa und ABarpaap heißen. ABarpaap liegt dabei etwas mehr nach innen gerichtet als ihre Schwester. Auf der linken Seite des Embryos existieren zum selben Zeitpunkt zwei bilateral symmetrische Nachkommen der ABpla (Abbildung 7.41 f). Bis zu diesem Zeitpunkt sind 64 AB-Zellen entstanden.

Zusammenfassung Ausbildung der rechten Seite des Embryos

Die rechte Seite wird von Nachkommen der ABar gebildet. Alle Teilungen verlaufen dabei in anterior-posterior Richtung. ABara-Abkömmlinge liegen dabei etwas weiter dorsal als die Nachkommen der ABarp.

Die Nachkommen der ABarp bilden also zusammen mit den Nachkommen der ABara mehr oder weniger eine Kette aus Zellen, deren Bezeichnung abwechselnd mit anterior und posterior endet, und die zusätzlich von innen zu den beiden Polen laufend paarweise um einen Verwandtschaftsgrad entfernter miteinander verwandt sind. Diese in Form von Eltern, Kindern, Enkeln, und Urenkeln miteinander verwandten Zellen etablieren unter Kettenformation die rechte Seite des Embryos.

7.8.3.3.2 Ausbildung der linken Seite des Embryos

Der linke ventrolaterale Bereich des Embryos wird von den Nachkommen der ABpl gebildet.

Wie schon in Kapitel 7.8.3.1 beschrieben, ist ABpl während des Übergangs vom 6- zum 8-Zellstadium von der Dorsalseite ausgehend an die linke Seite des Embryos in eine ventralere Schicht aufgestiegen (Abbildung 7.38). Hier teilt sie sich mit vorwiegend anterior-posterior Richtung in die Nachkommen ABpla und ABplp (Abbildung 7.41 a). Aufgrund einer zusätzlichen dorso-ventralen Komponente liegen die beiden Töchter nicht in derselben Ebene, sondern sind etwas in der Tiefe zueinander versetzt.

Durch die sich in rechts-links Richtung geteilte MS-Zelle wird ABpla ebenso wie ABarp auf der rechten Seite etwas nach lateral-posterior verschoben (Abbildung 7.41 a), so dass sich ABpla nun ventral ihrer Schwesternzelle ABplp befindet. Die weitere Entwicklung beschränkt sich so auf die Nachkommen von ABpla.

Mit der folgenden Teilung der ABpla in anterior-posterior Richtung entstehen die beiden Töchter ABplaa und ABplap (Abbildung 7.41 b). Sie erscheinen symmetrisch zu den auf der

rechten Seite gelegenen Zellen ABarpa und ABarpp. ABplap und ABarpp liegen dabei etwas mehr nach innen gerichtet als ihre jeweiligen anterioren Schwestern (Abbildung 7.41 d).

Durch die etwas auseinander weichenden C-Zellen werden ABplaa und ABplap nun zusammengeschoben und vor allem ABplap wird so überdeckt, dass nur noch die Teilungsrichtung der anterioren Zelle ABplaa mit Bestimmtheit als anterior-posterior zu bezeichnen ist und die Töchter ABplaaa und ABplap hervorgebracht werden. Es liegen zu diesem Zeitpunkt 32 AB-Zellen vor.

Zusammenfassung Ausbildung der linken Seite des Embryos

Die linke Seite wird durch fortschreitende anterior-posterior Teilungen der ABpl etabliert. Obwohl sowohl ABpla als auch ABplp an der Bildung beteiligt sind, machen die Nachkommen der ABpla den Hauptanteil des linken ventrolateralen Bereichs aus. ABplp und ihre Nachkommen liegen dorsaler. Im Unterschied zur rechten Seite liegen ABpla und ABplp auf der linken Seite jedoch posteriorer als ABara und ABarp (siehe Kapitel 7.8.3.4).

7.8.3.4 Zusammenfassung Symmetriebildung der AB-Zellen in den anterior-ventralen und ventro-lateralen Bereichen von „P. mekong“

Zusammenfassend wird für den beobachteten Zeitraum hinsichtlich der Teilungen innerhalb der AB-Zelllinie folgendes Schema deutlich: Die rechte Seite des „P. mekong“ Embryos wird zu gleichen Teilen von Nachkommen der ABara und Nachkommen der ABarp gebildet. Fortlaufende anterior-posteriore Teilungen führen zu Kettenbildung und damit zur Etablierung der rechten Seite.

Die linke Seite wird von Nachkommen der ABpl gebildet. Auch hier führen fortlaufende anterior-posteriore Teilungen zur Etablierung der linken Seite. Es scheint jedoch, als gehe der Hauptanteil der Zellen auf Nachkommen der ABpla zurück. ABplp liegt posterior und dorsal ihrer Schwester und kann demzufolge nur einen kleinen Beitrag zur linken Seite beisteuern. Schon im 14-Zellstadium zeigt sich die anterior gelegene Tochter von ABpl, ABpla symmetrisch zu der posterior gelegenen Tochter von ABar, ABarp (Abbildung 7.41 a). Diese frühe bilaterale Symmetrie bleibt auch unter ihren Nachkommen erhalten (Abbildung 7.41 d).

Verwandtschaftlich vergleichbare Zellen der rechten und linken Seite des Embryos sind nicht symmetrisch zueinander. Der Ursprung in der Verschiebung liegt in der Durchmischung der anterioren und posterioren Zellen (Kapitel 7.8.3.1) und in der Bildung des anterioren Bereiches durch Nachkommen der ABal (Kapitel 7.8.3.2), die später auf der linken Seite fehlen. Welche Zellen auf der linken Seite später den ABara-Nachkommen der rechten Seite entsprechen, ist nicht bekannt. Es könnte sich zum einen um sich nach anterior verlagernde Nachkommen von ABpla handeln. Dies würde auch eine Verlagerung der Nachkommen der ABplp implizieren. Zum anderen könnte es sich um Nachkommen von ABall handeln.

Der anterior-ventrale Bereich wird zunächst von Nachkommen der ABall gebildet (Kapitel 7.8.3.2). Eingeschobene dorsal-ventral Teilungen bedingen Schichtenbildung in diesem Teil

des Embryos. Durch Wanderung gegen Ende des Beobachtungszeitraums bedecken rechte und linke Nachkommen der ABallv unter Nahtbildung zunehmend die gesamte anteriore Ventralseite des Embryos. Nachrückende Abkömmlinge, wahrscheinlich von ABallvd, gelangen an den anterioren Pol.

Die Positionen der Abkömmlinge von ABalr und ABpr konnten aufgrund mangelnder Transparenz nicht nachvollzogen werden. Wegen ihrer anfänglichen Lage wird jedoch vermutet, dass ABalr den anterior-dorsalen Bereich und ABpr den posterior-dorsalen Bereich begründet.

Da die Bildung des anterioren Bereiches komplett aus Nachkommen der ABal-Zellen, also aus vormals linken Zellen erfolgt, müßte im Gegenzug auf der rechten Seite des Embryos ein Überschuß an Zellen über die für die Seitenbildung nötigen Zellen hinaus bestehen. Man kann vermuten, dass diese überschüssigen rechten Zellen im posterioren Bereich eine ebensolche Symmetrie bilden, wie es für linke Anteile im anterioren Bereich gezeigt werden konnte. Ein Hinweis darauf ist die den posterioren Bereich einnehmende ABplp und die Symmetriebildung zwischen den Nachkommen der ABpla und ABarp.

Anders als bei *C. elegans*, bei dem sich im 4-Zellstadium das gesamte linke Paar dem rechten Paar gegenüber nach anterior verschiebt und so eine frühe Asymmetrie innerhalb der AB-Linie begründet wird, fehlt bei „P. mekong“ eine derartige globale Verschiebung linker AB-Zellen.

C. elegans und „P. mekong“ ist gemeinsam, dass die AB-Zellen im Gegensatz zu den anderen somatischen Linien eine Sonderstellung hinsichtlich der Etablierung der bilateralen Symmetrie einnehmen. Die von *C. elegans* bekannte Symmetrie innerhalb der linken AB-Zellen ist bei „P. mekong“ jedoch auf eine viel kleinere Gruppe innerhalb der ABallvv-Nachkommen im anterioren Bereich des Embryos beschränkt. Andere Subpopulationen der AB-Linien hingegen bilden mit den Seitenbereichen bilateral symmetrische Strukturen aus von Anfang an rechten und linken AB-Nachkommen zueinander aus.

Die Etablierung der bilateralen Symmetrie innerhalb der AB-Zelllinie kann also weder mit der von *C. elegans* noch mit der innerhalb der anderen Zelllinien von „P. mekong“ gleichgesetzt werden, sondern muss für jede Subpopulation unabhängig betrachtet werden.

7.9 Regulation

7.9.1 Regulationsfähigkeit bei „P. mekong“ und *D. coronatus*

Um die Regulationsfähigkeit bei diesen beiden Spezies zu überprüfen, wurde die EMS-Zelle jeweils im 4-Zellstadium direkt nach ihrer Entstehung ablatiert (n=8) und das Verhalten der verbleibenden Blastomeren analysiert. Dabei wurden drei Kriterien für eine mögliche Zellschicksalstransformation der C-Zelle zum EMS-Schicksal herangezogen:

1. veränderte Teilungsrichtung der C-Zelle
2. Aufspaltung der Nachkommen in zwei verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichem Zellteilungsverhalten

3. Einwanderung einer Subpopulation und Akkumulation von Acridinorange

Bei „P. mekong“ konnten in keinem Fall Anzeichen für eine Zellschicksalstransformation der C-Zelle gefunden werden.

Weder zeigten die beiden Nachkommen von C ein derart voneinander abweichendes Zellteilungsverhalten, das eine Aufspaltung in zwei verschiedene Zelllinien andeuten würde, noch wanderte eine Subpopulation zu irgendeinem Zeitpunkt in das Zentrum ein. Auch die übrigen Blastomeren zeigten keinerlei Besonderheiten in ihrer weiteren Entwicklung.

Bei zwei Embryonen von *D. coronatus* teilte sich die C-Zelle zwar abweichend von der transversen Teilung mit einer anterior-posterioren Orientierung. Im Zuge der weiteren Entwicklung richteten sich die beiden Tochterzellen aber wieder rechts-links zueinander aus. Alle weiteren Nachkommen teilten sich synchron und zeigten kein voneinander abweichendes Verhalten. Einwanderung von C-Nachkommen fand nicht statt. Nach den oben genannten Kriterien fand keine Aufspaltung der Zelllinie bzw. Transformation statt.

Nach 19 h zeigt der terminale Phänotyp eine aus dem Zellverband ausgeschleuste und an einen Pol verlagerte ablatierte EMS-Zelle. Die übrigen Blastomeren haben sich vielfach weiter geteilt und sind in ihrer Gesamtheit zu Muskelzuckungen fähig (Abbildung 7.26).

Um die auf diese Weise behandelten Embryonen auf Akkumulation von Acridinorange zu testen, wurde überprüft, ob bei vor der Ablation mit Acridinorange gefütterten Tieren abgegrenzte Bereiche unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchten (jeweils n=20).

Abbildung 7.42 zeigt die Akkumulation von Acridinorange bei unbehandelten Embryonen von „P. mekong“ (a-c, A-C) und die Verteilung von Acridinorange bei EMS-ablatierten Embryonen (d, D). Im 2E-Zellstadium von unbehandelten Embryonen zeigt sich eine diffuse Fluoreszenz im gesamten Embryo (a, A). Im 8E-Zellstadium beginnt sich der Farbstoff im E-Zellbereich zu akkumulieren und aus den anderen Bereichen zu verschwinden (b, B). Das späte Kommastadium zeigt eine intensive Fluoreszenz im Darmprimordium (c, C). Bei EMS-ablatierten Embryonen findet keine Anreicherung von Acridinorange in den Nachkommen von P₂, darunter C-Zellen, statt. Hätte eine Transformation von C-Zellen stattgefunden, würde dieser Bereich vermehrt fluoreszieren und die Fluoreszenz aus anderen Bereichen verschwinden. AB- und P₂-Nachkommen konnten allerdings ihre cytoplasmatisch ererbten fluoreszierenden Granula bewahren, die hier nicht in die E-Zelle transformiert werden konnten (EMS ablatiert). Die tote EMS-Zelle hat dagegen ihre Fluoreszenz wahrscheinlich aufgrund von laserinduzierter Membranschädigung verloren (d, D).

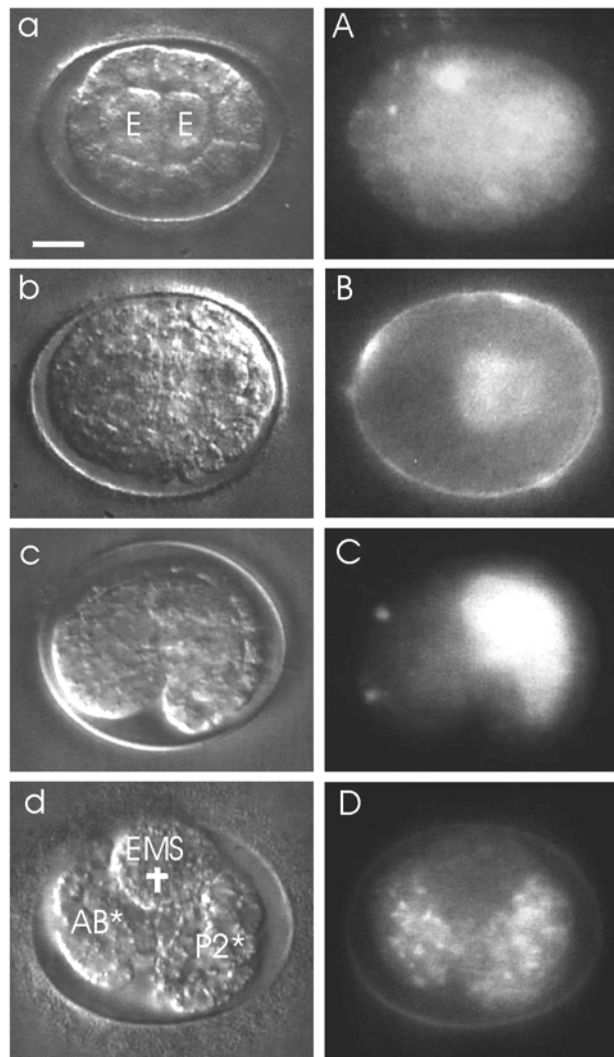


Abbildung 7.42: Akkumulation von Acridinorange im unbehandelten (a-c, A-C) und EMS-ablatierten (d, D) Embryo von „Plectus mekong“, modifiziert aus Lahl *et al.*, 2003. (a, A) 2E-Zellstadium mit diffuser Fluoreszenz, (b, B) 8E-Zellstadium mit beginnender Akkumulation im E-Zellbereich, (c, C) spätes Kommastadium mit Akkumulation im Darmprimordium, intensive Fluoreszenz verschleiert granulären Charakter, (d, D) EMS-ablatierter terminaler Phänotyp, Fluoreszenz aus EMS fast verschwunden, kein Transport oder Anreicherung in P₂-Nachkommen. (a) bis (d) Nomarski-optik, (A) bis (D) Epifluoreszenz Orientierung anterior=links. Eichstrich: 10µm

Auch bei *D. coronatus* tritt keine Akkumulation in einer Subgruppe von C auf. Hinsichtlich der Regulationsfähigkeit ähneln *D. coronatus* und „P. mekong“ somit eher dem Verhalten von *C. elegans* als dem von *A. nanus*.

8 Ergebnisse der Untersuchung parasitärer Nematoden

8.1 Vorwort zur Embryonalentwicklung parasitärer Nematoden

Untersuchungen zur Übertragung von Parasiten begannen bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts vornehmlich an *T. spiralis* durch Herbst, Leuckart, Virchow und Zenker. Inzwischen sind Übertragung und Epidemiologie sehr vieler Parasiten gut bekannt. Die Beobachtungen zur Entwicklung beschränken sich jedoch fast ausnahmsweise auf Larvalstadien.

Die Embryogenese ist dagegen kaum untersucht worden und frühe Stadien werden mit sehr unspezifischen Bezeichnungen wie „Morula“, „vermiform“, „Vielzellstadium“ oder „nicht/wenig/hoch embryoniert“ (z. B. Winfield, 1933 und Smith, 1953) belegt. Der Zustand der Eier im Kot wird meist nur zu rein diagnostischen Zwecken genutzt. Zellbiologische Arbeiten sind kaum durchgeführt worden. Abbildungen sogar in Lehrbüchern sind oft von schlechter Qualität und zeigen teilweise alte, sich schon zersetzende Embryonen.

Vor allem die Arbeiten an *A. megalocephala* (*Parascaris equorum*) von Boveri (1887, 1892, 1899, 1910) aber auch die einiger anderer Autoren darunter sein Konkurrent zur Strassen (1896) und dessen Schüler Müller (1903) sind dabei eine der wenigen Ausnahmen, in denen wichtige Teilaspekte der Embryogenese sehr gut beschrieben sind. Schon früh wurde mit den bescheidenen Mitteln der Hellfeldmikroskopie die frühe Keimbahn-Soma-Trennung, die Konstanz der Keimbahn, Zelleutelie und die unter Nematoden sehr seltene Chromatindiminution erkannt. In verschiedenen Experimenten zeigte Boveri, dass die frühe Determination von Zellen auf qualitativen Unterschieden im Cytoplasma beruht. An anderer Stelle demonstrierte er die Kontinuität der Chromosomen als individuelle Einheiten (Schierenberg, 1978). Die zellautonome Entwicklung für Nematoden bestätigte sich jedoch später bei Untersuchungen an *C. elegans* nicht.

Die Eier der in dieser Arbeit untersuchten Parasiten sind in der Regel stärker mit Granula angefüllt als die von freilebenden Nematodenspezies. Auch ist ihre Schale oft dicker und weniger transparent. Dies behindert die mikroskopische Arbeit und verschlechtert die Qualität der Abbildungen deutlich.

Eine Ausnahme davon stellt *T. spiralis* da. Hier besitzen die Eier zwar eine sehr dünne, transparente Schale, die eine gute Sicht auf die Blastomeren zulässt. Durch die nur sehr wenigen Granula ist das Cytoplasma jedoch sehr kontrastarm, so dass Zellgrenzen und Zellkerne kaum hervortreten und eine fortlaufende Beobachtung der Teilungen nicht möglich ist.

8.2 *Heterakis spumosa*

8.2.1 Morphologie von *H. spumosa*

Der getrenntgeschlechtliche Nematode *H. spumosa* ist mit 7-13 mm bei Weibchen und 6-10 mm bei Männchen wesentlich größer und im Verhältnis zur Länge dünner als die untersuchten freilebenden Nematoden. Sein Ösophagus besitzt einen wenig abgegrenzten, flaschenförmigen Bulbus. Der Darm liegt stark in Schlingen.

Beim Männchen (Abbildung 8.1) fällt vor allem das Hinterende auf. Präanaler Saugnapf, Alae, Papillen und zwei Spicula dienen als Kopulationshilfen. Der Hoden ist einlappig angelegt. Er beginnt ungefähr in der Körpermitte, verläuft ein kurzes Stück anterior und knickt dann nach posterior um. Weiter distal schließt sich die Samenblase an, die über ein Vas deferens zusammen mit dem Darm in die Kloake, die ungefähr mittig zwischen den Caudalflügeln (Alae) liegt, mündet.

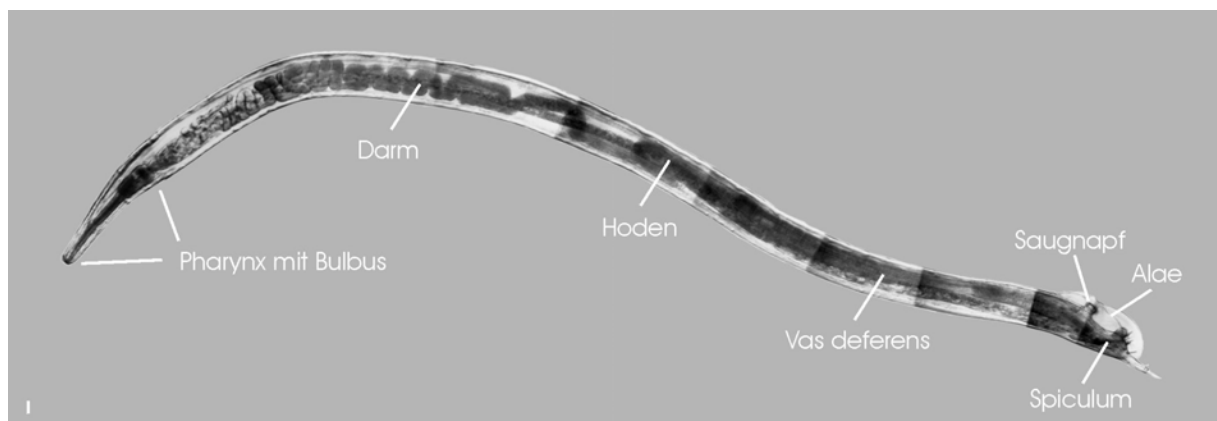


Abbildung 8.1: Nomarskiauflage eines männlichen *Heterakis spumosa*. Eichstrich: 10µm

Beim Weibchen ist die Gonade zweiarmig angelegt und schlägt jeweils nach anterior und posterior um. Die Biegung des posterioren Armes kann man sehr gut in Abbildung 8.2 erkennen. Der Durchmesser der Gonade ist im Vergleich zur Größe des Eies wesentlich größer als bei freilebenden Spezies. Die Gonade ist sehr stark mit Eiern angefüllt und *H. spumosa* legt eine Vielzahl von Eiern auch außerhalb des Wirtes ab. Die Vulva liegt in der Mitte des Tieres. Der weibliche Schwanz ist unauffällig und endet in einer Spitze.

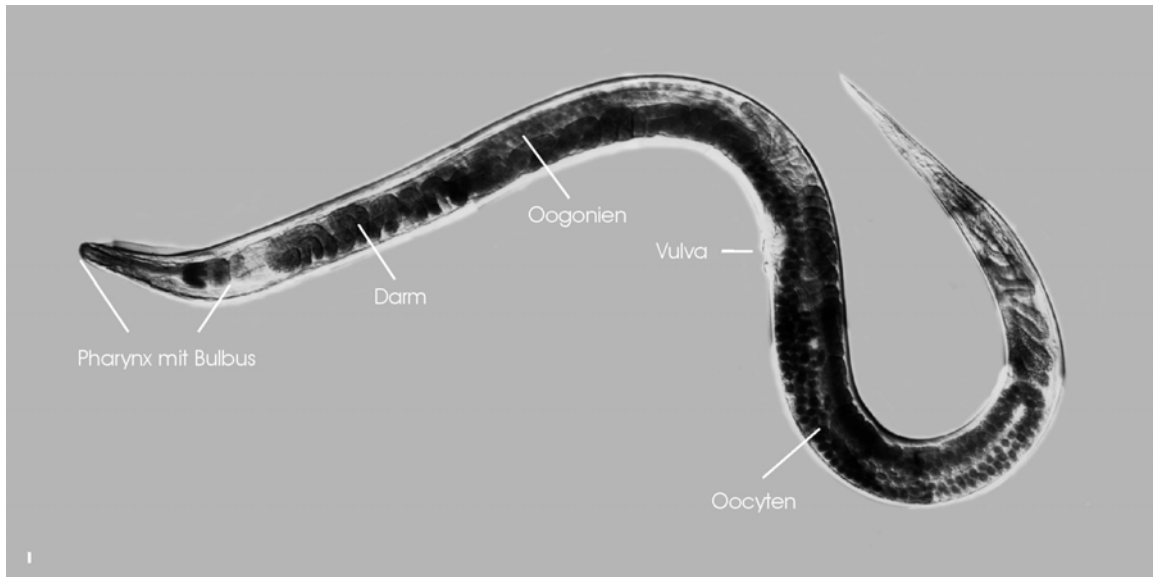


Abbildung 8.2: Nomarskiaufnahme eines weiblichen *Heterakis spumosa*. Eichstrich: 10µm

8.2.2 Embryologie von *H. spumosa*

Die Eier von *H. spumosa* sind ca. 70 µm x 38 µm groß und besitzen eine sehr dicke, widerstandsfähige Schale mit konturierter Oberfläche (Abbildung 8.3a). Das Cytoplasma ist reich an Granula. Abbildung 8.3 zeigt einige frühe Embryonalstadien von *H. spumosa*.

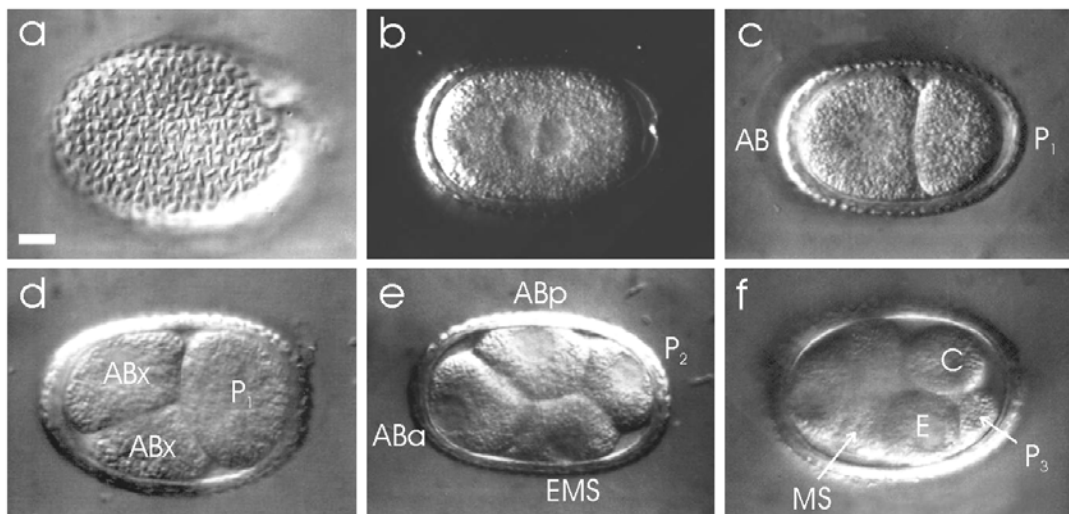


Abbildung 8.3: Frühe Embryonalstadien von *Heterakis spumosa*. Linke Lateralansicht. (a) Oberfläche der Eischale, (b) Vorkernstadium, (c) 2-Zellstadium, (d) 3-Zellstadium, (e) 4-Zellstadium, (f) 8-Zellstadium. Nomarskioptik, Eichstrich: 10µm

Nach der Vorkernverschmelzung, die meist noch im Elterntier stattfindet, entsteht die Zygote P_0 . Zu diesem Zeitpunkt ist einer von zwei Polkörpern am posterioren Pol sichtbar.

Wie bei *C. elegans* erfolgt die erste Teilung in eine größere anteriore Zelle (AB) und eine kleinere posteriore Zelle (P_1), lediglich das Größenverhältnis ist etwas zu Gunsten der anterioren Zelle verschoben (Abbildung 8.3 c). Da auch die folgenden Teilungen und

Positionen denen von *C. elegans* sehr ähneln, wird die von *C. elegans* bekannte Nomenklatur verwendet. Aus den nächsten beiden Teilungen, der AB-Zelle mit transverser Spindelstellung (Abbildung 8.3 d) und der P₁-Zelle mit longitudinaler Spindelstellung, geht ein von *C. elegans* bekanntes rhomboides 4-Zellstadium mit den gleichen Zell-Zellkontakten hervor (Abbildung 8.3 e).

Nach und nach scheinen die gleichen somatischen Gründerzellen und die Urkeimzelle aus Teilungen der Keimbahn bzw. Teilung der EMS hervorzugehen wie bei *C. elegans*. Dabei bilden sich einzelne Zelllinien heraus, deren Angehörige sich gleichzeitig teilen und mit *C. elegans* vergleichbare Positionen im Embryo einnehmen. Im 8-Zellstadium befindet sich die kleinste Zelle als Keimbahnzelle P₃ am posterioren Pol, MS und E befinden sich mittig ventral nebeneinander, C ist posterior-dorsal positioniert (Abbildung 8.3 f).

Das Zellteilungsmuster von *H. spumosa* ist wie bei *C. elegans* konstant und invariabel (Tabelle 7).

<i>Heterakis spumosa</i>	
Zelle in Teilung	Zellstadium
P ₀	2
¹ AB ²	3
P ₁	4
² AB ⁴	6
EMS	7
P ₂	8
⁴ AB ⁸	12
¹ MS ²	13
P ₃	14
¹ E ²	15
¹ C ²	16
⁸ AB ¹⁶	24

Tabelle 7: Abfolge der Zellteilungen bei *Heterakis spumosa*. Grau unterlegtes Feld markiert den Beginn der Gastrulation.

Mit Erreichen des 24-Zellstadiums beginnt auch bei *H. spumosa* die Gastrulation, in deren Zuge die beiden Darmvorläuferzellen Ea und Ep ins Zentrum des Embryos verlagert werden.

Abbildung 8.4 a zeigt dabei die ventralste Schicht eines solchen Embryos. Deutlich sind die mit Sternchen markierten, einsinkenden E-Zellen zu erkennen. P₄ hat dabei Kontakt zur posterioren E-Zelle. Anterior sind die beiden mit Kreuzchen gekennzeichneten MS-Zellen zu sehen. Die Seiten des Embryos werden von AB-Zellen gebildet. Bis zu diesem Zeitpunkt konnten keine individuellen Variationen in der räumlichen Musterbildung beobachtet werden. Über dieses Stadium hinausgehende Untersuchungen konnten aufgrund der schlechten Transparenz nicht mehr den gesamten Embryo erfassen.

Nachdem die beiden Darmvorläuferzellen ins Innere des Embryos eingewandert sind, teilen sie sich in vier Zellen (Abbildung 8.4 b). Es erscheint wahrscheinlich, dass der Darm von *H. spumosa* wie bei *C. elegans* ausschließlich aus Nachkommen der E-Zelllinie gebildet wird,

da keine darmbildende Einwanderung von Gruppen anderen Ursprungs als E beobachtet wurde. Im weiteren Verlauf zeigt sich ein von *C. elegans* bekannter Dottertransfer in die Darmzellen des Embryos. Dabei verliert die anteriore Hälfte des Embryos ab einem Stadium von mehreren hundert Zellen zunehmend ihre Granula. Dies setzt sich über die gesamte weitere Embryogenese fort, lässt sich aber am besten zu diesem Zeitpunkt beobachten (Abbildung 8.4 c-f).

Die Morphogenesestadien verlaufen über Bohnen- (ventrale Einbuchtung des Embryos), Komma-, Kaulquappen-, Pflaumen-, Brezel- und Schlingenstadium bis zur mehrfach gewundenen Larve im Ei (Abbildung 8.4 d-f). Nach ein paar Stunden der Bewegung wird die Larve inaktiv. Ein Schlupf findet nicht statt.

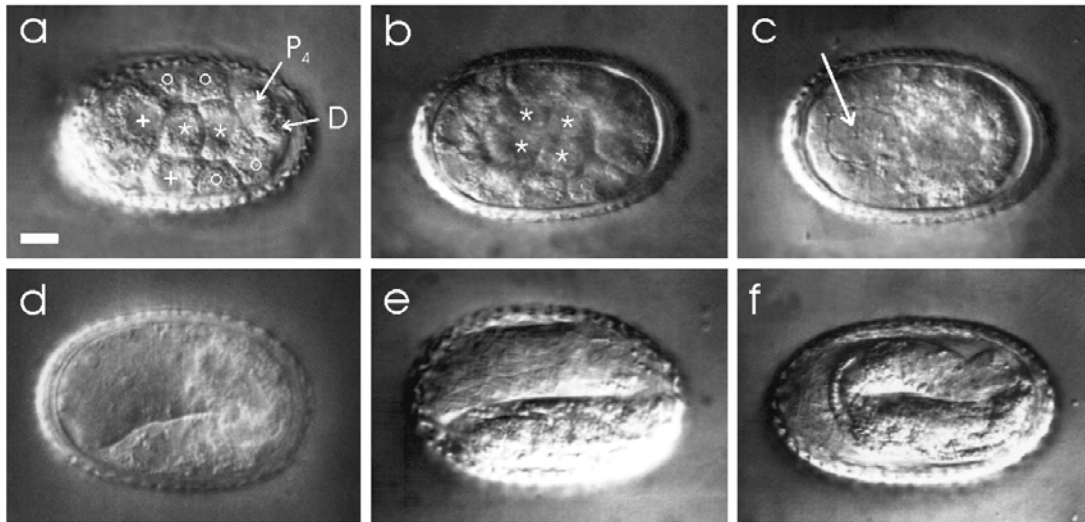


Abbildung 8.4: Spätere Embryonalstadien von *Heterakis spumosa*. (a) ca. 24-Zellstadium, Beginn der Gastrulation, Ventralansicht, (b) 4E-Zellstadium, zentrale Fokusebene, (c) Aufteilung des Embryos in einen granulären und einen weitgehend agranulären Bereich, Pharynx-Primordium deutlich abgegrenzt (Pfeil), (d) Kaulquappenstadium, (e) Pflaumenstadium, (f) vollständig embryoniertes Ei mit inaktiver, infektiöser Larve (L₃). * E-Zellen, ° AB-Zellen, + MS-Zellen. Nomarskiptik, Eichstrich: 10µm

Die Embryogenese von *H. spumosa* schreitet sehr langsam voran. Bei einer Umgebungstemperatur von 28° C dauert allein die Entwicklung vom 1- zum 4-Zellstadium 18 h. 28 h vergehen bis das 8-Zellstadium erreicht ist. Nach 5 Tage befindet sich der Embryo im 100-Zellstadium.

H. spumosa zeigt eine große Toleranz gegenüber hohen Temperaturen. Die Entwicklungsgeschwindigkeit ist stark temperaturabhängig. 28° C scheint die Grenze für eine schnellstmögliche Entwicklung zu sein. Bei einer Erhöhung der Temperatur auf 36° C ist Embryogenese weiterhin möglich, eine Beschleunigung findet jedoch nicht statt. Erniedrigt man die Temperatur jedoch auf 16° C, verzögert sich die Entwicklung drastisch: Nach 24 h befinden sich noch alle Embryonen im 1-Zellstadium. Fünf Tage später haben sie sich zu 4- und 8-Zellstadien entwickelt.

Setzt man Vorkern- bzw. 1-Zellstadien einer Temperatur von 10° C aus, wird sämtliche Entwicklung eingestellt. Auf diese Weise kann man die Embryonen sehr gut bevorraten. Auch Mehrzellstadien stellen ihre Embryogenese bei dieser Temperatur ein. Die Entwicklung wird wieder aufgenommen, wenn die Embryonen, egal welchen Stadiums, in eine wärmere Umgebung verbracht werden.

8.3 *Nematospiroides dubius*

8.3.1 Morphologie von *N. dubius*

N. dubius ist getrenntgeschlechtlich. Das Weibchen ist mit ca. 25 mm deutlich länger als das ca. 10 mm große Männchen. Beide Geschlechter zeigen eine starke spiralförmige Aufwindung des gesamten Körpers. Das Vorderende ist dabei oft von Schlingen verdeckt. Wie bei den meisten hier untersuchten Parasiten ist der Bulbus des Ösophagus wenig abgegrenzt und flaschenförmig. Der Darm ist mehr oder weniger stark dunkel pigmentiert (Abbildung 8.5, Abbildung 8.6).

Der Hoden des Männchens ist unpaar angelegt und führt über eine Samenblase und ein Vas deferens zur Kloake. Der Schwanz ist zu einer Bursa copulatrix ausgeformt. Deutlich sind die Strahlen und die beiden ausgefahrenen Spicula zu sehen (Abbildung 8.5 b). Abbildung 8.5 c-f zeigt verschiedene Stadien der Spermatogenese, die schließlich in der Bildung von Spermatiden mündet (Abbildung 8.5 e). Mit dem Legen der Eier werden auch Spermien, die nicht zur Befruchtung gelangt sind, durch die Vulva des Weibchens ausgestoßen. Sie sind ca. 50 µm lang und stecknadelförmig (Abbildung 8.5 f).

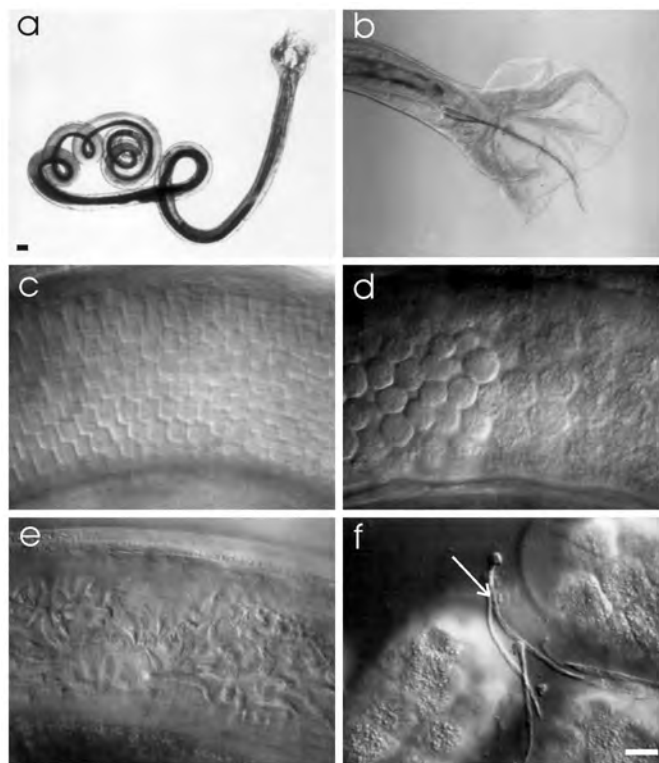


Abbildung 8.5: Männlicher *Nematospiroides dubius* und Gonadenausschnitte. (a) Männchen, (b) Bursa copulatrix mit ausgefahrenen Spicula, (c)

Gonadenausschnitt anterior, (d) Gonadenausschnitt Mitte, (e)
 Gonadenausschnitt posterior mit Spermatiden, (f) gelegte Eier mit durch die
 Vulva ausgestoßenen Spermien (Pfeil). Nomarskiopik, Eichstrich: 10µm

Die Gonade des Weibchens erstreckt sich fast über die gesamte Länge des Tieres. Sie hat wie bei *H. spumosa* einen großen Durchmesser. Relativ weit anterior ist die Gonadenspitze zu erkennen. Die Vulva befindet sich sehr weit posterior. Der Schwanz endet in einer abgestumpften Spitze. (Abbildung 8.6).

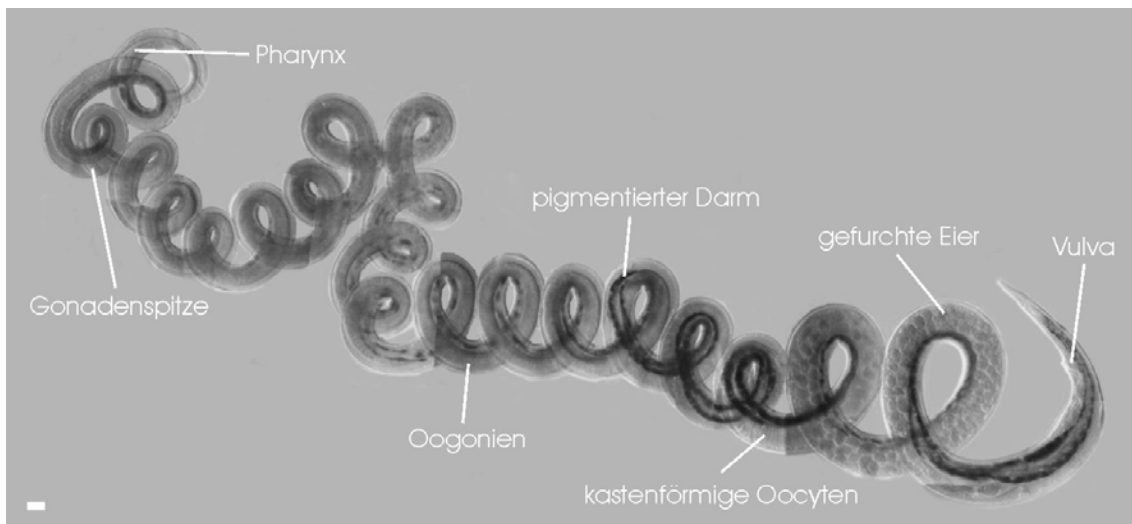


Abbildung 8.6: Nomarskiaufnahme eines weiblichen *Nematospiroides dubius*. Eichstrich: beachte **100µm**

Abbildung 8.7 zeigt einen Ausschnitt einer weiblichen Gonade. Die anterior gelegenen kastenförmigen Oocyten reifen zu ovalen Oocyten heran, die einzeln die Spermatheka passieren und dort befruchtet werden. Anschließend beginnen die Eier mit der Furchung.

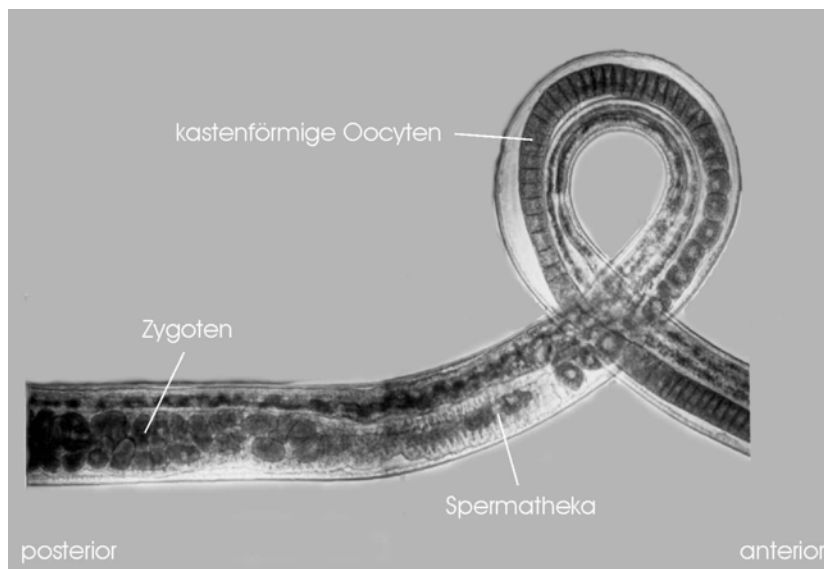


Abbildung 8.7: Ausschnitt aus einem weiblichen Gonadenschlauch von *Nematospiroides dubius*. Links = posteriores Ende, rechts = anteriores Ende. Nomarskiopik.

8.3.2 Embryologie von *N. dubius*

Die Eier von *N. dubius* sind im Mittel 82 μm x 53 μm groß. Die Schale ist glatt und erscheint ähnlich dick wie die von *C. elegans*. Das Cytoplasma ist reich an feinkörnigen Granula. Die Eiablage erfolgt ca. ab dem 24-Zellstadium. Um die davor liegende Entwicklung beobachten zu können, wurde die Gonade aufgeschnitten und Vorkernstadien wurden ausgewählt. Abbildung 8.8 zeigt die Embryogenese von *N. dubius* bis zum 4-Zellstadium.

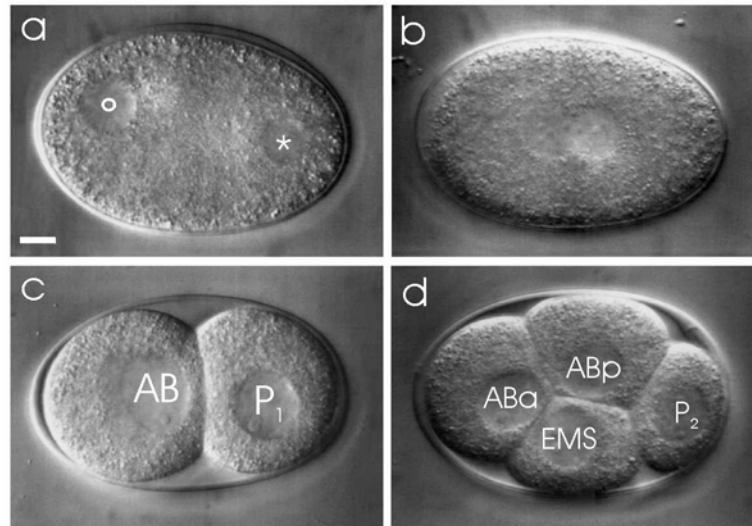


Abbildung 8.8: Frühe Embryonalstadien von *Nematospiroides dubius*. (a) männlicher und weiblicher Vorkern kurz nach der Befruchtung, (b) Verschmelzung der beiden Vorkerne, (c) 2-Zellstadium, (d) 4-Zellstadium. Lateralansicht, anterior = links, Nomarskioptik. Eichstrich: 10 μm

Männlicher und weiblicher Vorkern wandern von entgegengesetzten Polen aufeinander zu (Abbildung 8.8 a) und verschmelzen schließlich (Abbildung 8.8 b). Die erste Teilungsspindel ist längs ausgerichtet, so dass anterior die somatische AB und am posterioren Pol die Keimbahnzelle P₁ entstehen. Auffällig und anders als bei *C. elegans* ist der geringe Größenunterschied der beiden Zellen (Abbildung 8.8 c).

Im Weiteren teilt sich AB schräg in die beiden Töchter ABa und ABp. Kurz darauf bringt P₁ die Nachkommenzellen EMS und die neue Keimbahn P₂ hervor, so dass sich ein wie von *C. elegans* bekanntes rhomboides 4-Zellstadium ergibt. Die Kerne von ABa und EMS sind dabei wie bei *C. elegans* einander zugewandt (Abbildung 8.8 d).

Obwohl das Schicksal der einzelnen Zelllinien nicht bis zu deren Beteiligung an bestimmten Geweben verfolgt werden konnte, erfolgt auch die weitere Benennung der Blastomeren von *N. dubius* aufgrund ihrer gleichartigen Abstammung und ihres vergleichbaren Verhaltens gemäß der von *C. elegans*. Dabei scheinen die gleichen somatischen Gründerzellen wie bei *C. elegans* sowie die Urkeimzelle P₄ hervorzugehen.

Die somatischen Zellen entstehen entweder als Töchter bei Teilungen von Keimbahnzellen (AB, C, D) oder aus Teilung der EMS (E, MS). Bei der Teilung einer Keimbahnzelle entsteht die neue Keimbahnzelle immer posterior ihrer größeren somatischen Schwester (Abbildung

8.8 c,d). Eine Ausnahme davon stellt die Teilung der P_2 dar, bei der die neue Keimbahnzelle P_3 anterior ihrer somatischen Schwester C und so mit Kontakt zur E-Zelllinie entsteht (Abbildung 8.9 a). Dieser als Polaritätsumkehr bezeichnete Vorgang findet auch bei *C. elegans* und einigen anderen Nematoden statt.

Auch bei *N. dubius* teilen sich die Zelllinien gemäß einem bestimmten Zellteilungsmuster, das konstant und invariabel zu sein scheint (Tabelle 8). Die einzelnen Zellen nehmen reproduzierbare Positionen innerhalb des Embryos ein.

<i>Nematospiroides dubius</i>	
Zelle in Teilung	Zellstadium
P_0	2
$^1AB^2$	3
P_1	4
$^2AB^4$	6
EMS	7
P_2	8
$^4AB^8$	12
$^1MS^2$	13
$^1E^2$	14
$^1C^2$	15
P_3	16
$^8AB^{16}$	24
$^2MS^4$	26
$^2C^4$	28
$^2E^4$	30
$^{16}AB^{32}$	46
$^1D^2$	47
$^4MS^8$	51
$^4C^8$	55
$^{32}AB^{64}$	87

Tabelle 8: Abfolge der Zellteilungen bei *Nematospiroides dubius*. Grau unterlegtes Feld markiert den Beginn der Gastrulation.

Abbildung 8.9 zeigt die Aufspaltung der EMS-Zelle in MS und E (a) und die anschließende Einwanderung der beiden E-Zellen (b-e). Im 8-Zellstadium von *N. dubius* liegen MS und E anterior-posterior zueinander an der Ventralseite des Embryos. Die Keimbahnzelle P_3 bildet den posterioren Pol, C liegt dorsal von ihr. Zwei von vier AB-Zellen liegen im Fokus, zwei außerhalb (Abbildung 8.9 a). Bei allen untersuchten Embryonen liegt in diesem Stadium der Kern der E-Zelle asymmetrisch der P_3 -Zelle zugewandt. Mit der Teilung von vier in acht AB-Zellen dreht sich der Embryo meist von seiner Lateralseite so, dass die Ventralseite dem Betrachter zugewandt ist (Abbildung 8.9 b).

Recht bald nach der Entstehung von 2 E-Zellen beginnt deren Immigration von der Ventralseite ausgehend. Abbildung 8.9 b stellt diese ventrale Schicht eines solchen 15-zelligen Embryos dar. Noch liegen die beiden E-Zellen mit den beiden MS-Zellen und der Keimbahnzelle P_3 in einer Ebene.

Kurze Zeit später, die AB-Linie und die Keimbahn haben sich inzwischen geteilt, sind die beiden Darmvorläuferzellen bereits etwas in die Tiefe eingesunken, so dass sie nun nicht mehr in einer Fokusebene mit den MS-Zellen liegen (Abbildung 8.9 c). Zum Vergleich ist in Abbildung 8.9 d die ventrale Schicht desselben Embryos gezeigt. Deutlich sieht man die zum Teil eingewanderten E-Zellen gegenüber der oberflächlich liegenden P₄.

Im weiteren Verlauf immigrieren die E-Zellen weiter. In Abbildung 8.9 e ist die Einwanderung der E-Zellen abgeschlossen. Die beiden Darmvorläuferzellen liegen im Zentrum des Embryos und haben ihre Teilungen fortgesetzt (Abbildung 8.9 f).

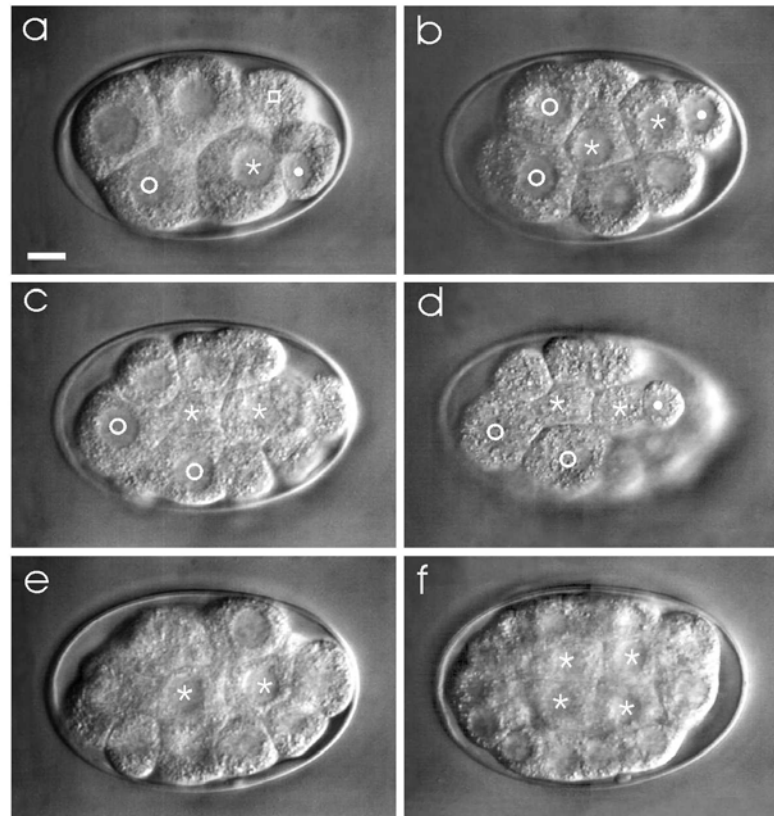


Abbildung 8.9: Gastrulation bei *Nematospirroides dubius*. (a) 8-Zellstadium, linke Lateralansicht, (b) 15-Zellstadium, ventrale Fokusebene, E-Zellen mit MS-Zellen und Keimbahn in einer Ebene, (c) ca. 24-Zellstadium, zentrale Fokusebene, E-Zellen partiell in die Tiefe abgesunken, (d) ca. 24-Zellstadium, ventrale Fokusebene, (e) ca. 26-Zellstadium, zentrale Fokusebene, E-Zellen im Zentrum, (f) ca. 46-Zellstadium, zentrale Fokusebene, 4-E-Zellstadium. ° MS-Zellen, * E-Zellen, weiße Kugel= Keimbahnzelle, weißes Quadrat=C-Zelle. (a) anterior = links, (b) – (f) Ventralansicht. Nomarski-optik. Eichstrich: 10µm

Wie gezeigt erfolgt die Gastrulation bei *N. dubius* wie bei *C. elegans* mit zwei Darmvorläuferzellen. Eine Teilung der Zellen findet erst nach Abschluss der Einwanderung im Zentrum des Embryos statt. Ob der Darm jedoch ausschließlich aus der E-Zelllinie gebildet wird, kann nicht abschließend geklärt werden.

Die Morphogenesestadien verlaufen wie bei *C. elegans* über Bohnen-, Komma-, Kaulquappen-, Pflaumen-, Brezel- und Schlingenstadium.

Abbildung 8.10 zeigt einige ausgewählte Morphogenesestadien. Vom 1-Zellstadium bis zum Bohnenstadium vergehen ca. 14 h. Das Kommastadium ist nach weiteren 30 min erreicht. Im Kaulquappenstadium befindet sich das Tier ca. 16 h nach dem 1-Zellstadium, im Pflaumenstadium 18 h und im Brezelstadium 20-21 h nach dem 1-Zellstadium.

Der Embryo kann bis zu 12 h im anschließenden Schlingenstadium verbringen, bis die L₁ schließlich schlüpft.



Abbildung 8.10: Morphogenesestadien von *Nematospirroides dubius*. (a) Kaulquappe, (b) Pflaume, (c) Brezel. Nomarski-optik. Eichstrich: 10 µm

Die geschlüpften Larven (L₁) (Abbildung 8.11 a) sind im Mittel 334 (280 – 375) µm lang bei einem Pharynxbulbusquerdurchmesser von 21 µm. Sie werden auf mit *E. coli* beschichtete Plectus-Platten verbracht.

Die ersten L₂ treten ca. 34 h später auf. Sie sind ca. 438 (412 – 483) µm lang und haben einen Pharynxbulbusdurchmesser von 25 µm. Abbildung 8.11 b bis e zeigt den Pharynx und die Gonade von L₁ (b, c) und L₂ (d, e).

Beide Larvenstadien haben einen charakteristischen rhabditiden Pharynx mit kugeligem Bulbus und Klappenapparat. Die Gonadenanlage ist bei beiden Stadien noch sehr klein.

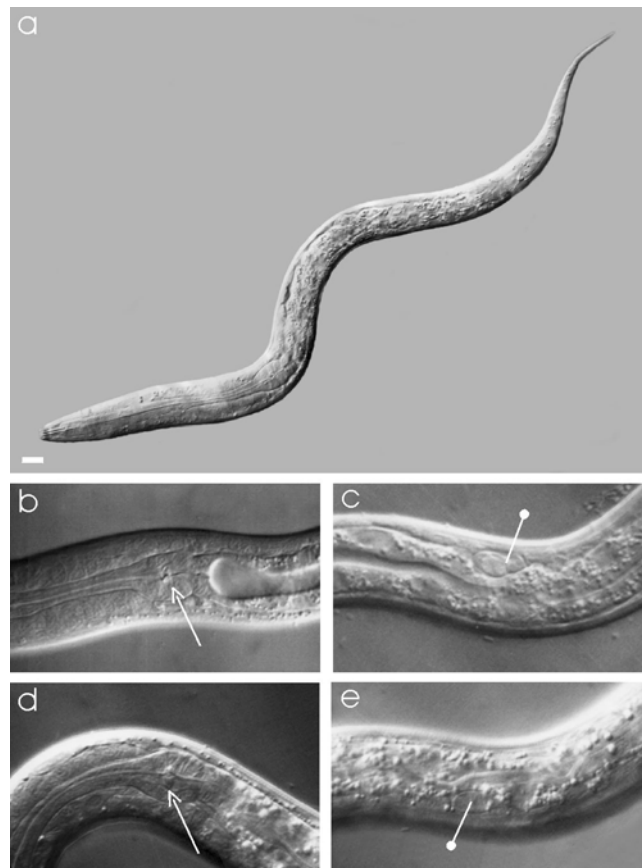


Abbildung 8.11: Larvalstadien L₁ und L₂ von *Nematospiroides dubius*. (a) – (c) L₁, (d) + (e) L₂.
 (a) Habitus einer frisch geschlüpften L₁, (b) Pharynx einer L₁, (c) Gonadenanlage einer L₁, (d) Pharynx einer L₂, (e) Gonadenanlage einer L₂.
 Nomarskiophtik.

Weitere ca. 28 h später haben sie sich zur bescheideten L₃ (Abbildung 8.12) entwickelt. Alle Zeitangaben beziehen sich auf eine Temperatur von ca. 25° C.



Abbildung 8.12: Bescheidete L₃ von *Nematospiroides dubius*. (a) Habitus einer bescheideten L₃, (b) Pharynx einer bescheideten L₃. Nomarskiophtik. Eichstrich: 10µm

Abbildung 8.12 zeigt eine bescheidete L₃ von *N. dubius*. Sie ist ca. 500 µm (mit Hülle) lang und filariform (Abbildung 8.12 a). Der Pharynx unterscheidet sich deutlich von dem der bisherigen Larvalstadien von *N. dubius*. Er ist gestreckt, der Bulbus ist flaschenförmig und hat seinen Klappenapparat verloren (Abbildung 8.12 b).

Larven von *N. dubius* überlebten und entwickelten sich ca. einen Monat auf *E. coli* beschichteten Plectus-Platten. Mangels eines Wirtes starben sie dann im L₃-Stadium ab.

Frühe Embryonalstadien von *N. dubius* lassen sich wesentlich schlechter lagern als die von *H. spumosa*. Ein Arrest der Embryogenese bei niedrigen Temperaturen findet nicht statt. Stattdessen wird die Entwicklung bei Absenken der Temperatur zunehmend fehlerhaft. Bei einer Lagerung bei 16° C und vor allem bei 4° C sinkt die Larvenausbeute deutlich gegenüber der bei Zimmertemperatur von 100% auf 50% bzw. auf 25%.

Embryonen höherer Zellstadien tolerieren dagegen tiefere Temperaturen sehr gut. 90% der Embryonen schlüpfen bei einer Temperatur von 16° C, wenn sie erst als 24-Zellstadium dahin verbracht wurden. Bei hohen Temperaturen (36° C) findet keine Embryogenese statt. Alle Eier arretieren in ihrem jeweiligen Stadium.

8.4 *Nippostrongylus brasiliensis*

8.4.1 Morphologie von *N. brasiliensis*

N. brasiliensis ist getrenntgeschlechtlich. Beide Geschlechter zeigen eine ähnliche spiralförmige Aufwindung wie *N. dubius*, das Männchen etwas weniger als das Weibchen. Das Vorderende wird dabei oft von Schlingen verdeckt, während das Hinterende selten eingerollt ist. Der adulte Bulbus des Ösophagus ist wie bei *N. dubius* wenig abgegrenzt und flaschenförmig. Auch der Darm ist mehr oder weniger stark dunkel pigmentiert (Abbildung 8.13, Abbildung 8.15). Die Kutikula weist eine Ringelung auf und laterale Alae ziehen den Körper entlang, von denen vor allem beim Weibchen der caudale Teil stark ausgeprägt ist (Abbildung 8.15). Der Kopf ist bei beiden Geschlechtern durch eine Einschnürung der Kutikula vom übrigen Körper abgesetzt (Abbildung 8.13).

Das Männchen von *N. brasiliensis* (Abbildung 8.13) misst ca. 3,6 mm (2,1 – 4,5 mm). Der Hoden ist unpaar angelegt und schlägt am anterioren Ende, das sich wenig posterior des Pharynxbulbus befindet, um.

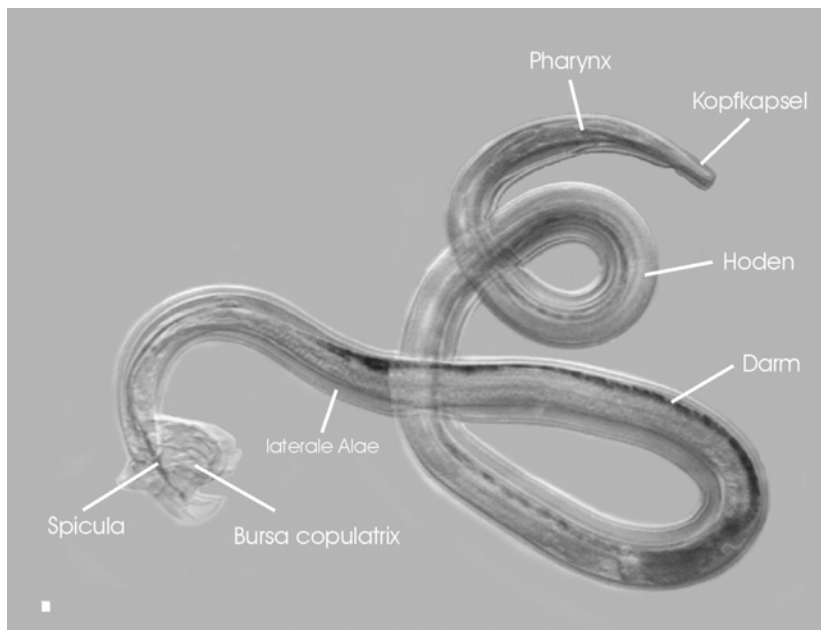


Abbildung 8.13: Nomarskiauflage eines männlichen *Nippostrongylus brasiliensis*.

Eichstrich: beachte **100mm**

Abbildung 8.14 a zeigt einen posterior gelegenen Ausschnitt aus dem Hoden eines Männchens mit den darin enthaltenen Spermatocyten. Spermien sind ca. 20 μm lang. Der Schwanz endet in einer Bursa copulatrix. Ihre Strahlen sind deutlich in Abbildung 8.14 b zu erkennen. *N. brasiliensis* besitzt zwei Spicula, die in Abbildung 8.13 halb ausgefahren sind.

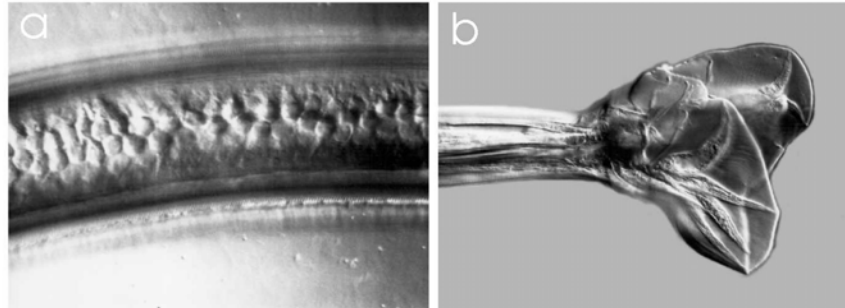


Abbildung 8.14: Ausschnitt aus dem Gonadenschlauch (a) und Schwanzende (b) eines männlichen *Nippostrongylus brasiliensis*. Nomarskioptik.

Das Weibchen von *N. brasiliensis* (Abbildung 8.15) ist im Mittel 4,8 mm (2,5 – 6,2 mm) lang. Auch hier erstreckt sich die Gonade fast über die gesamte Länge des Tieres, hat einen großen Durchmesser und ist angefüllt mit den unterschiedlichen Reifestadien der Eier.

In Abbildung 8.15 ist die Gonadenspitze zu sehen. Die kleinen Oogonien reifen unter Aufnahme von Dotter zu größeren, kastenförmigen Oocyten heran. Kurz vor der Spermatheka verlieren sie diese Form und werden oval. Die Oocyten passieren einzeln die Spermatheka und werden dort befruchtet. Kurz danach beginnt die Furchung noch im Elterntier (Abbildung 8.15, Abbildung 8.16 a).

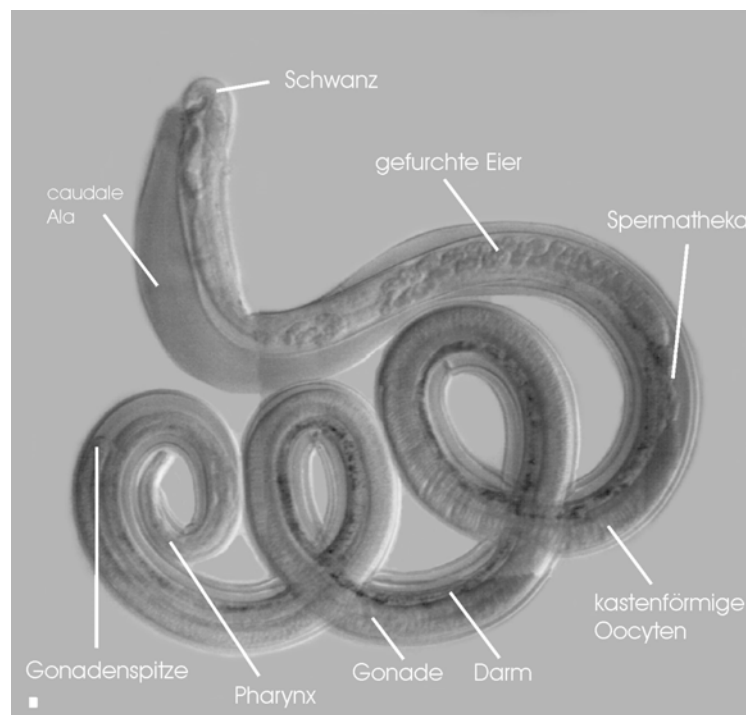


Abbildung 8.15: Nomarskiaufnahme eines weiblichen *Nippostrongylus brasiliensis*. Eichstrich: beachte **100mm**

Abbildung 8.16 a zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Spermatheka des Weibchens. Zur Orientierung vergleiche mit Abbildung 8.15. Deutlich sind die schmalen, kastenförmigen Oocyten mit ihren langgestreckten Kernen zu erkennen.

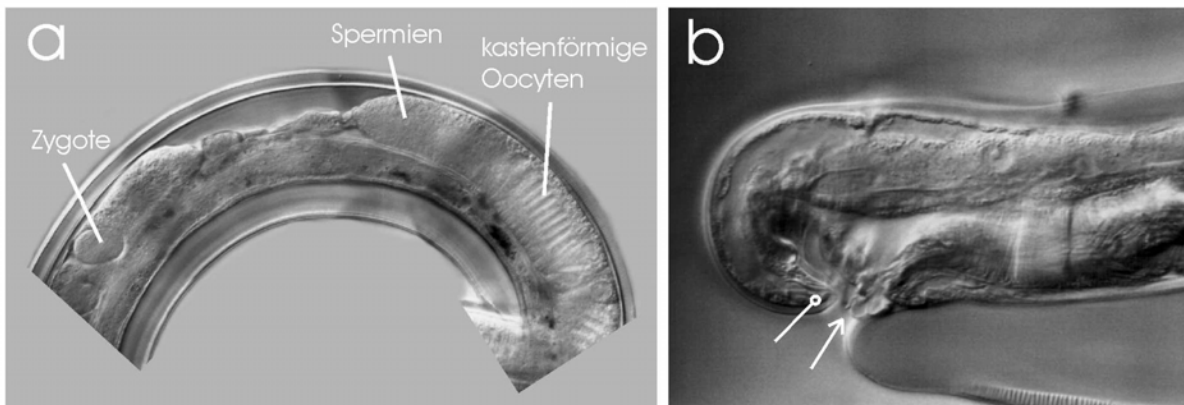


Abbildung 8.16: Spermatheka (a) und Schwanzende (b) eines weiblichen *Nippostrongylus brasiliensis*. Anus=Pfeil mit Kugelkopf, Vulva=Pfeil mit Spitze. Rechts = anterior. Nomarskiptik.

Der Schwanz des Weibchens ist auffällig anders geformt als bei den übrigen untersuchten Parasiten. Der Anus liegt an der Schwanzspitze, die abgespreizt werden kann. Wenig darunter, am Ende der Ala gelegen, befindet sich die Vulva (Abbildung 8.16 b).

8.4.2 Embryologie von *N. brasiliensis*

Die Eier von *N. brasiliensis* werden im 16- bis 20-Zellstadium gelegt und sind ca. 58 µm x 32 µm groß. Die Schale ist glatt und ähnlich dick wie bei *C. elegans*. Das Cytoplasma ist mit feinkörnigen Granula angefüllt. Da die Furchung schon im Uterus einsetzt, muss auch hier die Gonade eröffnet werden, um an frühere Stadien zu gelangen.

Auch bei *N. brasiliensis* erfolgt die Benennung der Zellen aufgrund ihrer gleichartigen Abstammung und ihres vergleichbaren Verhaltens entsprechend der von *C. elegans*.

Aus der Urkeimzelle P_0 bzw. aus den weiteren Keimbahnzellen entstehen demnach die somatischen Gründerzellen AB, C, D und die Urkeimzelle P_4 . Aus Teilung der somatischen P_1 -Tochter EMS gehen die beiden somatischen Gründerzellen E und MS hervor. Bei der Teilung einer Keimbahnzelle entsteht die neue Keimbahnzelle immer posterior ihrer größeren somatischen Schwester. Eine Ausnahme davon ist die Polaritätsumkehr bei der Teilung der P_2 , bei der die neue Keimbahnzelle P_3 anterior ihrer somatischen Schwester C entsteht (Abbildung 8.17 c).

Die einzelnen Zelllinien von *N. brasiliensis* teilen sich gemäß einem bestimmten Zellteilungsmuster, das konstant und invariabel zu sein scheint. Die Blastomeren nehmen reproduzierbare Positionen innerhalb des Embryos ein. Individuelle Variationen in der räumlichen Anordnung von Zellen zueinander konnten nicht beobachtet werden. Tabelle 9 zeigt die Abfolge der Zellteilungen bei *N. brasiliensis* in der frühen Embryogenese.

<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	
Zelle in Teilung	Zellstadium
P ₀	2
¹ AB ²	3
P ₁	4
² AB ⁴	6
EMS	7
P ₂	8
⁴ AB ⁸	12
¹ MS ²	13
¹ C ²	14
¹ E ²	15
P ₃	16
⁸ AB ¹⁶	24
² MS ⁴	26
² C ⁴	28
² E ⁴	30
¹ D ²	31
¹⁶ AB ³²	47
⁴ MS ⁸	51
⁴ C ⁸	55
⁴ E ⁸	59
² D ⁴	61
³² AB ⁶⁴	93
⁸ MS ¹⁶	101

Tabelle 9: Abfolge der Zellteilungen bei *Nippostrongylus brasiliensis*. Grau unterlegtes Feld markiert den Beginn der Gastrulation.

Abbildung 8.17 zeigt einige Stadien der frühen Embryogenese von *N. brasiliensis*.

Die somatische AB und die Keimbahnzelle P₁ sind annähernd gleich groß (Abbildung 8.17 a). Sie teilen sich schräg in die Töchter ABa und ABp bzw. EMS und P₂, so dass ein rhomboides 4-Zellstadium wie bei *C. elegans* entsteht (Abbildung 8.17 b).

Mit Erreichen des 8-Zellstadiums sind die somatischen Gründerzellen E, MS und C hinzugekommen. Zwei von vier AB-Zellen liegen dabei im Fokus, zwei außerhalb. Die Keimbahnzelle P₃ am posterioren Pol hat Kontakt zu E. Die Kerne der beiden Zellen liegen dabei asymmetrisch zueinander (Abbildung 8.17 c). Bei *C. elegans* ist diese asymmetrische Lage von Zellkernen Ausdruck einer stattfindenden Induktion (Schierenberg, 1987).

Ungefähr im 16-Zellstadium und damit sehr bald nach der Entstehung von 2 E-Zellen beginnt die Gastrulation. Abbildung 8.17 d zeigt die Ventralseite eines ca. 20-Zellstadiums, bei der die Einwanderung der beiden mit Sternchen markierten Darmvorläuferzellen gerade begonnen hat. Die Keimbahnzelle P₄ liegt dabei im Winkel zwischen Ea und Ep und wird den beiden Zellen als nächste ins Zentrum des Embryos folgen.

Abbildung 8.17 e und f zeigen einen ca. 55-zelligen Embryo. In der ventralen Schicht befinden sich acht MS-Zellen (e). Zur selben Zeit haben die beiden E-Zellen ihre Wanderung ins Zentrum des Embryos abgeschlossen und sich geteilt (f). Die Immigration der E-Zellen

von *N. brasiliensis* läuft somit ähnlich der von *C. elegans* ab. Abbildung 8.17 g + h zeigen jeweils die ventrale und die zentrale Ebene eines ca. 90-zelligen Embryos. Kurz vor ihrer Einwanderung befindet sich P_4 direkt posterior der acht MS-Zellen (g). In einem etwas dorsaler gelegenen optischen Schnitt sind die 8 E-Zellen zu sehen (h).

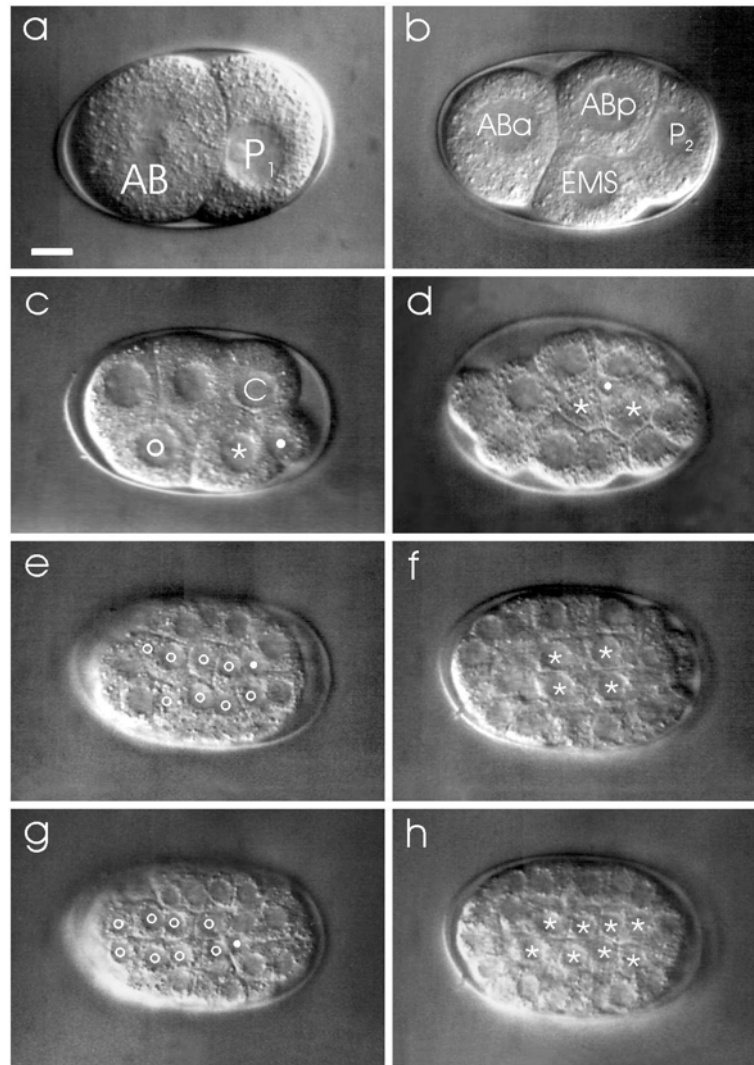


Abbildung 8.17: Frühe Embryonalstadien und Gastrulation von *Nippostrongylus brasiliensis*.

(a) spätes 2-Zellstadium, Metaphasenplatte in AB, (b) 4-Zellstadium, (c) 8-Zellstadium, 2 Zellen außerhalb der Fokusebene, (d) ca. 20-Zellstadium, Darmvorläuferzellen haben mit der Einwanderung begonnen, Keimbahnzelle P_4 im Winkel, (e) ca. 55-Zellstadium, ventrale Fokusebene, 8 MS-Zellen decken die Bauchseite ab, (f) ca. 55-Zellstadium, zentrale Fokusebene, die beiden eingewanderten Darmvorläuferzellen haben sich geteilt, (g) ca. 90-Zellstadium, ventrale Fokusebene, P_4 kurz vor der Einwanderung posterior der MS-Zellen, (h) ca. 90-Zellstadium, zentrale Fokusebene, 8 E-Zellen sind entstanden. ° MS-Zellen, * E-Zellen, weiße Kugel=Keimbahnzelle. (a) –(c) linke Lateralansicht, anterior = links, (d) – (h) Ventralansicht. Nomarski-optik. Eichstrich: 10µm

Der Embryo teilt sich weiter bis nach ungefähr 7 h bei Zimmertemperatur die Morphogenese mit Bildung des Bohnenstadiums beginnt. Das Kommastadium (Abbildung 8.18 a) sowie das nachfolgende Kaulquappenstadium (Abbildung 8.18 b) sind nach jeweils einer weiteren Stunde erreicht. Maximal 1 h, vergeht bis der Embryo sich im Pflaumenstadium befindet. Brezel- (Abbildung 8.18 c) und Schlingenstadium folgen jeweils in halbstündigem Abstand.

Die Morphogenese insgesamt nimmt ca. 4 h in Anspruch. Vom 1-Zellstadium bis zum Schlingenstadium vergehen ungefähr 11 h. Damit ähnelt die Geschwindigkeit der Embryogenese von *N. brasiliensis* der von *C. elegans* und ist deutlich höher als die von *N. dubius*, *H. spumosa* oder *T. muris*.

Der Embryo kann bis zu 7 h im Schlingenstadium verbleiben, bevor die L₁ nach insgesamt ca. 19 h schlüpft.



Abbildung 8.18: Morphogenesestadien von *Nippostrongylus brasiliensis*. (a) Komma, (b) Kaulquappe, (c) Brezel. Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

Die L₁ von *N. brasiliensis* ist im Durchschnitt 320 µm lang. Sie hat ein langes, gerades Mundrohr und einen typisch rhabditiden Pharynx mit Bulbus und Klappenapparat (Abbildung 8.19).

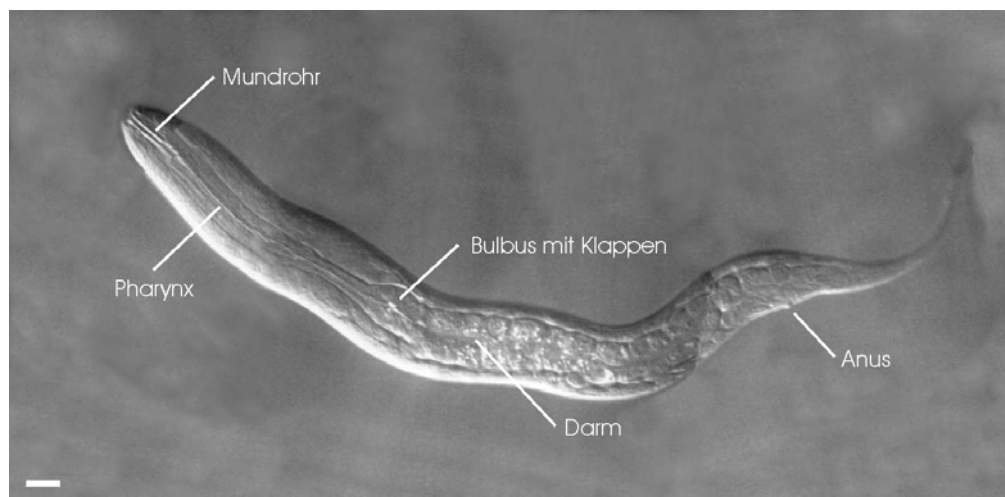


Abbildung 8.19: L₁ von *Nippostrongylus brasiliensis*. Nomarskiptik. Eichstrich: 10µm

Sie überlebt auf mit *E. coli* beschichteten Plectus-Platten und entwickelt sich weiter bis zur infektiösen, ca. 650 µm langen L₃. Dabei wandelt sie sich zunehmend in einen filariformen

Larventyp mit gestrecktem Pharynx ohne Klappen um. Nach ca. 4 Wochen auf Plectus-Platten stirbt sie ab.

Eier von *N. brasiliensis* sind temperaturempfindlich. Sie lassen sich schlecht lagern. Bei Kühlung findet kein reversibles Aussetzen der Embryogenese statt wie bei *H. spumosa*, sondern die Eier werden irreversibel geschädigt. Bei hohen Temperaturen (36° C) findet keine Embryogenese statt. Alle Eier arretieren in ihrem jeweiligen Stadium.

8.5 *Trichinella spiralis*

8.5.1 Morphologie von *T. spiralis*

Eine Übersicht der Morphologie von *T. spiralis* wurde bereits in Kapitel 5.2.8.1 gegeben. Abbildung 8.20 zeigt einige speziesspezifische Besonderheiten, die in der Literaturübersicht angesprochen wurden. Es sind dies die Körperoberfläche mit "hypodermal gland cells" (a), ein Ausschnitt aus dem glandulären Bereich des Stichosoms mit Stichocyten (b), das Schwanzende mit Gonadenspitze (c) und die unterschiedliche Oogoniengröße von lateral nach zentral bei hologenem Ovartyp (d).

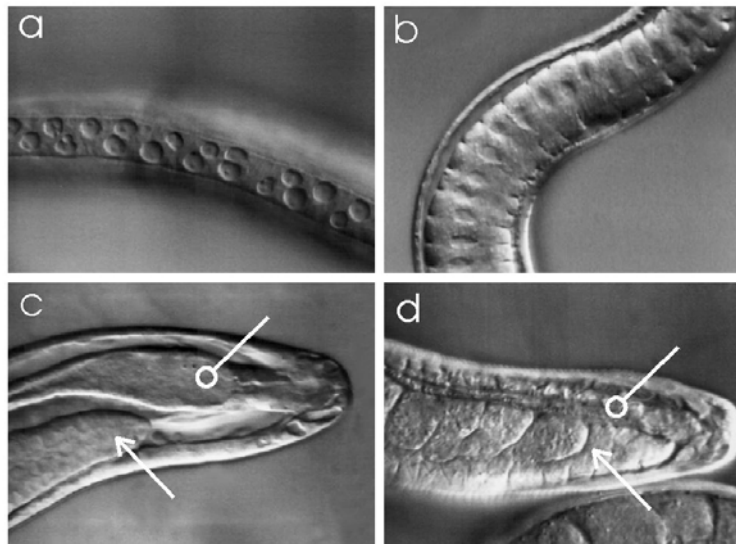


Abbildung 8.20: Morphologie von *Trichinella spiralis*. (a) Körperoberfläche mit "hypodermal gland cells", (b) Ausschnitt aus dem Stichosom, (c) Schwanzende eines jungen adulten Weibchens mit Gonadenspitze (Pfeilspitze) und Darm (Pfeil mit Kugelkopf), (d) Schwanzende eines älteren Weibchens mit Gonadenspitze (Pfeilspitze) und Darm (Pfeil mit Kugelkopf), an der unterschiedlichen Größe der Oogonien ist der hologene Ovartyp erkennbar. Nomarsikioptik.

8.5.2 Embryologie von *T. spiralis*

Die Eier von *T. spiralis* sind ca. 40 µm x 30 µm groß. Sie haben eine glatte, außerordentlich dünne Schale. Das Cytoplasma ist annähernd durchsichtig mit sehr wenigen Dottergrana, so dass die Abgrenzung einzelner Zellen besonders schwierig ist. Auch die Zellkerne heben

sich nur in niedrigen Stadien etwas gegenüber dem Cytoplasma ab. Schon in diesen Punkten unterscheidet sich *T. spiralis* sehr deutlich von allen anderen in dieser Arbeit untersuchten Nematoden. Die meisten Spezies haben eine dickere Schale als *C. elegans* und vor allem die Parasiteneier zeichnen sich ansonsten durch außerordentlich viele Granula sowie größere Festigkeit und Schalendicke aus.

Unter den hier getesteten Bedingungen entwickeln sich Embryonen von *T. spiralis* nach Verlust des Wirtes selbst innerhalb des Elterntieres nicht weiter. Eine Analyse der Embryonalentwicklung, bei der das Schicksal einzelner Zellen verfolgt wird, war bei *T. spiralis* somit nicht möglich. Abbildung 8.21 zeigt einige frühe Embryonen im Elterntier.

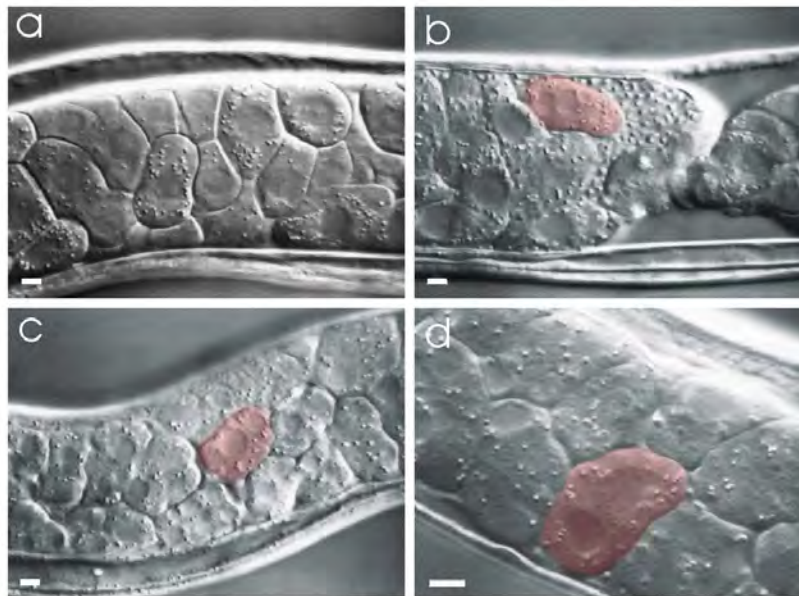


Abbildung 8.21: Frühe Entwicklungsstadien von *Trichinella spiralis* im Elterntier. (a) Oogonien, (b) Übergang Ovar (rechts) in die Spermatheka (links), Spermatheka ist mit Oogonien und Spermien gefüllt, farbig unterlegt = Embryo mit zwei Vorkernen, (c) frühe Teilungsstadien, farbig unterlegt = asymmetrisches 2-Zellstadium, (d) farbig unterlegt = 2-Zellstadium in Teilung, große Zelle in Teilung.

Auffällig ist das stark asymmetrische 2-Zellstadium bei *T. spiralis* (Abbildung 8.21 c). Der Größenunterschied ist wesentlich stärker ausgeprägt als bei allen untersuchten Secernentea. Es ähnelt in seiner Asymmetrie dem von *T. muris* (Abbildung 8.23 b, Abbildung 8.24 a), wie *T. spiralis* ebenfalls ein Vertreter der früheren Klasse Adenophorea. Wie bei *T. muris* teilt sich auch bei *T. spiralis* die große Zelle zuerst (Abbildung 8.21 d).

Obwohl die Abfolge der Zellteilungen nicht verfolgt werden konnte (siehe oben), lassen sich durch Aufschneiden der Gonade und Freisetzung der vorhandenen Stadien Momentaufnahmen machen und einige herausragende Besonderheiten von *T. spiralis* aufdecken. Abbildung 8.22 zeigt verschiedene Stadien der frühen Embryonalentwicklung von *T. spiralis*.

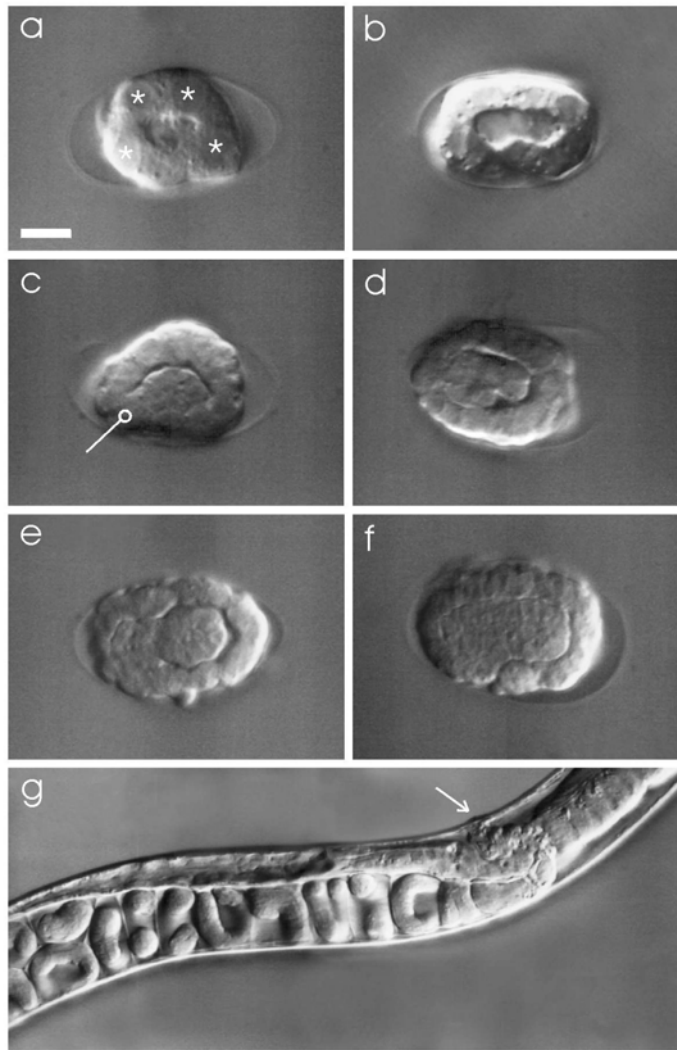


Abbildung 8.22: Frühe Embryogenesestadien und Blastocoelbildung bei *Trichinella spiralis*. (a) ca. 8-zelliger Embryo mit Blastocoel, (b) ca. 30 zelliger Embryo mit großem Blastocoel, (c) – (e) 50-100 zelliger Embryo mit eingeschobener Zellportion, (f) Embryo aus mehreren hundert Zellen mit großer, eingeschobener Zellportion, (g) Morphogenesestadien im Elterntier. * Zellkerne, Pfeil mit Kugelpopf=Verbindung der eingeschobenen Zellgruppe zum restl. Embryo, aus Übersichtsgründen nur in (c) eingezeichnet, Pfeil mit Spitze= Vulva. Nomarskioptik. Eichstrich: 10µm

Abbildung 8.22 a zeigt ein niedriges, fast kugelförmiges Embryonalstadium ungefähr 38 h p.i. In der dem Betrachter zugewandten Ebene können 4 Zellkerne (*) identifiziert werden. Es handelt sich hier wahrscheinlich um einen ca. 8-zelligen Embryo. Deutlich ist im Zentrum ein Hohlraum zu erkennen. Bild b zeigt ein etwas höherzelliges (ca. 30 Zellen) Stadium mit einem größeren Hohlraum.

Noch höherzellige Embryonen (Abbildung 8.22 c-f) besitzen keinen zentralen Hohlraum mehr. Stattdessen schiebt sich zwischen dem ca. 30- bis 50-Zellstadium eine Zellgruppe vom Rand aus ins Zentrum. In der weiteren Entwicklung vergrößert sich der zentrale Bereich gegenüber dem Randbereich des Embryos und macht einen immer größeren Anteil des

gesamten Embryos aus. Der Hohlraum wird dabei mehr und mehr ausgefüllt. Zu diesem Zeitpunkt (ca. 50 h p.i.) besteht der Embryo aus 50 bis 100 Zellen. Bei Embryonen mit mehreren hundert Zellen hat sich der Hohlraum bis auf einen schmalen, verbleibenden Spalt verkleinert. Die Zellen im Inneren scheinen kleiner zu sein als die der umgebenden äußeren Zelllage und besitzen deshalb wahrscheinlich eine höhere Teilungsrate (Abbildung 8.22 f).

Bei allen Embryonen (Abbildung 8.22 c-f) wird über die gesamte hier beobachtete Embryogenese die Verbindung des zentralen, eingeschobenen Anteils zum Rand durch einen breiten Stiel aufrechterhalten (Pfeil mit Kugelkopf, nur in (c) eingezeichnet). Der Randbereich erscheint dabei aus einer einschichtigen Zelllage zu bestehen.

Abbildung 8.22 g zeigt Morphogenesestadien kurz vor dem Schlupf im Elterntier. Sie ähneln denen von anderen Nematoden.

Da sowohl Herkunft als auch Schicksal der einzelnen Zellen unbekannt ist, kann keine Benennung der Zellen wie bei anderen Nematoden erfolgen. Es wird jedoch schnell deutlich, dass die Blastomeren andere Muster bilden und andere Schicksale in sich vereinen müssen als die Zellen der bisher untersuchten Nematoden. Obwohl nur ein kurzer Ausschnitt aus der Embryonalentwicklung von *T. spiralis* nachvollzogen werden konnte, zeigen sich schon hier erhebliche Unterschiede zu den bisher untersuchten Nematoden.

Das 2-Zellstadium von *T. spiralis* zeigt eine größere Asymmetrie als die AB- und P₁-Zelle von *C. elegans*. Der Größenunterschied ist ähnlich dem des 2-Zellstadiums von *T. muris* (Abbildung 8.23 b).

Die Hohlraumbildung und das anschließende Einschieben einer erheblichen Zellzahl ins Zentrum ist von *C. elegans* und den anderen hier untersuchten Nematoden vollkommen unbekannt. Schierenberg (2005) machte ähnliche Beobachtungen an *Tobrilus diversipapillatus*. Hier findet die Gastrulation unter Blastocoelbildung statt. Die morphogenetische Zellbewegung konnte in eine erste und eine zweite Phase unterschieden werden, in denen Endoderm und Mesoderm gebildet wurde.

Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich auch bei dem Hohlraum von *T. spiralis* um ein Blastocoel, in das Endoderm und Mesoderm vordringen.

T. diversipapillatus (Clade II) und *T. spiralis* (Clade I) sind somit bis heute die einzigen Nematodenspezies, bei denen diese besondere, bei anderen Tierstämmen jedoch weit verbreitete Form der Gastrulation nachgewiesen werden konnte.

Eine weitere Besonderheit von *T. spiralis* ist die auffallende Andersartigkeit der Eier gegenüber denen der anderen in dieser Arbeit untersuchten Parasiten. Sie besitzen ausgesprochen wenig Granula (Dotter) und sind sehr dünnwandig. Dies zusammen mit der Tatsache, dass die Embryonen außerhalb der Mutter nicht überlebten und die normale Embryogenese inklusive Schlupf komplett innerhalb des Elterntieres abläuft, die Spezies also vivipar ist, legt die Vermutung nahe, dass die Nachkommen während ihrer Entwicklung auf die Mutter angewiesen sind. Vielleicht findet eine Ernährung des Embryos durch den mütterlichen Organismus statt.

Die Vorstellung einer Ernährung von Embryonen durch die Mutter wird unterstützt durch kürzliche Beobachtung eines viviparen Diplogastriden, bei dem ein deutliches Wachstum der Eier während der Embryogenese stattfindet (persönliche Mitteilung Einhard Schierenberg).

8.6 *Trichuris muris*

8.6.1 Morphologie von *T. muris*

Eine Übersicht der Morphologie von *T. muris* wurde bereits in Kapitel 5.2.9.1 gegeben. Da die Eier von der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen wurden, bestand kein Zugang zu adulten Tieren.

8.6.2 Embryologie von *T. muris*

T. muris legt seine Eier im Vorkernstadium ab. Die Eier sind ca. 70 μm x 30 μm groß und haben das typische Aussehen von *Trichuris* sp.: eine glatte, sehr dicke Schale und an den Polen eine pfropfartige Struktur (Operculum). Das Cytoplasma ist sehr granulär (Abbildung 8.23).

Abbildung 8.23 und Abbildung 8.24 zeigen einige Stadien der frühen Embryonalentwicklung von *T. muris*. Die Benennung der Zellen erfolgt bei *T. muris* wegen der Ähnlichkeit der Blastomeren in Aussehen und Position gemäß der Vorgabe von Malakhov *et al.* (1984) für *T. trichiura* (siehe Kapitel 5.2.9.2).

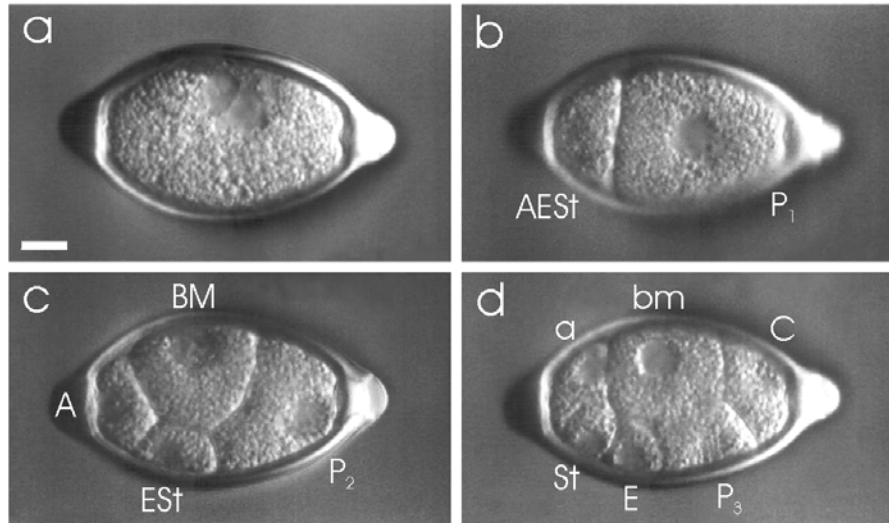


Abbildung 8.23: Frühe Embryonalstadien von *Trichuris muris*. (a) Vorkernstadium, (b) 2-Zellstadium, (c) 4-Zellstadium, (d) 8-Zellstadium, a₁-Zelle und beta-my außerhalb der Fokusebene. Nomarski-optik. Eichstrich: 10 μm

Abbildung 8.23 a zeigt das Vorkernstadium von *T. muris*. Nach Verschmelzung der Vorkerne teilt sich die Zygote asymmetrisch mit anterior-posteriorer Spindelstellung in die kleine, somatische, anterior gelegene AEST-Zelle und die sehr viel größere, posteriore Keimbahnzelle P₁ (Abbildung 8.23 b, Abbildung 8.24 a). Bei *C. elegans* ist dagegen immer

jeweils die Keimbahnzelle die kleinere der beiden Zellen. Auch fällt der Größenunterschied der beiden Blastomeren dort nicht so gravierend aus wie bei *T. muris*.

Die anschließende Teilung der großen P_1 erfolgt wiederum mit anterior-posteriorer Spindelstellung. Jedoch fehlt dieser Teilung der stark asymmetrische Charakter der vorherigen Teilung. Die anterior gelegene Tochterzelle BM und die posteriore P_2 sind annähernd gleich groß. Im resultierenden 3-Zellstadium liegen AEst, BM und P_2 in einer Reihe entlang der Längsachse des Embryos (Abbildung 8.24 b). Auch die folgende Teilung der somatischen AEst in die gleich großen Töchter A und Est ist fast symmetrisch. Die Teilungsrichtung ist dabei anterior-posterior mit einer geringen transversen Komponente, so dass sich ein in Abbildung 8.23 c gezeigtes 4-Zellstadium ergibt.

Im Folgenden teilt sich BM transvers in die beiden gleich großen Zellen bm und beta-my (Abbildung 8.23 d, nur bm im Fokus). Bei der Teilung der Keimbahnzelle P_2 kommt es zu einer Polaritätsumkehr, so dass die neue Keimbahnzelle P_3 anterior ihrer am posterioren Pol gelegenen Schwester C zu liegen kommt (Abbildung 8.23 d, Abbildung 8.24 c). Nach der anschließenden Teilung von A in a und a_1 sowie der Aufspaltung von Est in die gleich großen Töchter E und St besteht der Embryo aus 8 Zellen. Die kleinen Zellen a, a_1 , E und St bilden den anterioren Pol, die große C den posterioren Pol (Abbildung 8.23 d).

Verglichen mit *C. elegans* und den anderen in dieser Arbeit untersuchten Nematodenspezies ist die Verteilung der einzelnen Entwicklungsschicksale auf die Blastomere bei *T. muris* auffallend anders realisiert. Auch spalten sie sich auf andere Weise voneinander ab und bilden ein vollkommen anderes räumliches Muster aus. Während bei *C. elegans* die somatischen Gründerzellen bis auf die Ausnahme von EMS einzeln von der jeweiligen Keimbahnzelle abgespalten, werden bei *T. muris* bereits mit der Teilung von P_0 in P_1 und AEst drei Schicksale (A, E, St) von der Keimbahnzelle abgetrennt. Die Gründerzellschicksale BM, C, D und F werden dagegen direkt von der jeweiligen Keimbahn abgespalten. Ein weiterer Unterschied ist, dass das Darmschicksal (E) entgegengesetzt zu den meisten anderen Spezies mit der anterioren Blastomere des 2-Zellstadiums verknüpft ist.

Mit Erreichen des 9-Zellstadiums (Abbildung 8.24 d) hat sich P_3 in P_4 und D geteilt. Neben der andersartigen räumlichen Musterbildung und Zellschicksalsverteilung ist bei *T. muris* auch die anhaltende Teilungsaktivität der Keimbahnzelle jenseits des P_4 -Stadiums auffällig (Tabelle 10). Mit Erreichen des 22-Zellstadiums entstehen im Zuge der anterioren-posterioren Teilung von P_4 mit F und P_5 Zellen, die bei *C. elegans* unbekannt sind (Abbildung 8.24 e+f). Für *T. trichiura* nehmen Malakhov *et al.* (1984) an, dass es sich bei F um eine somatische Zelle und bei P_5 um eine weitere Keimbahnzelle handelt. Im 40-Zellstadium teilt sich die P_5 von *T. muris* nochmals mit anterior-posteriorer Spindelstellung in die beiden Zellen P_{5a} und P_{5b} mit ebenfalls unbekanntem Schicksal.

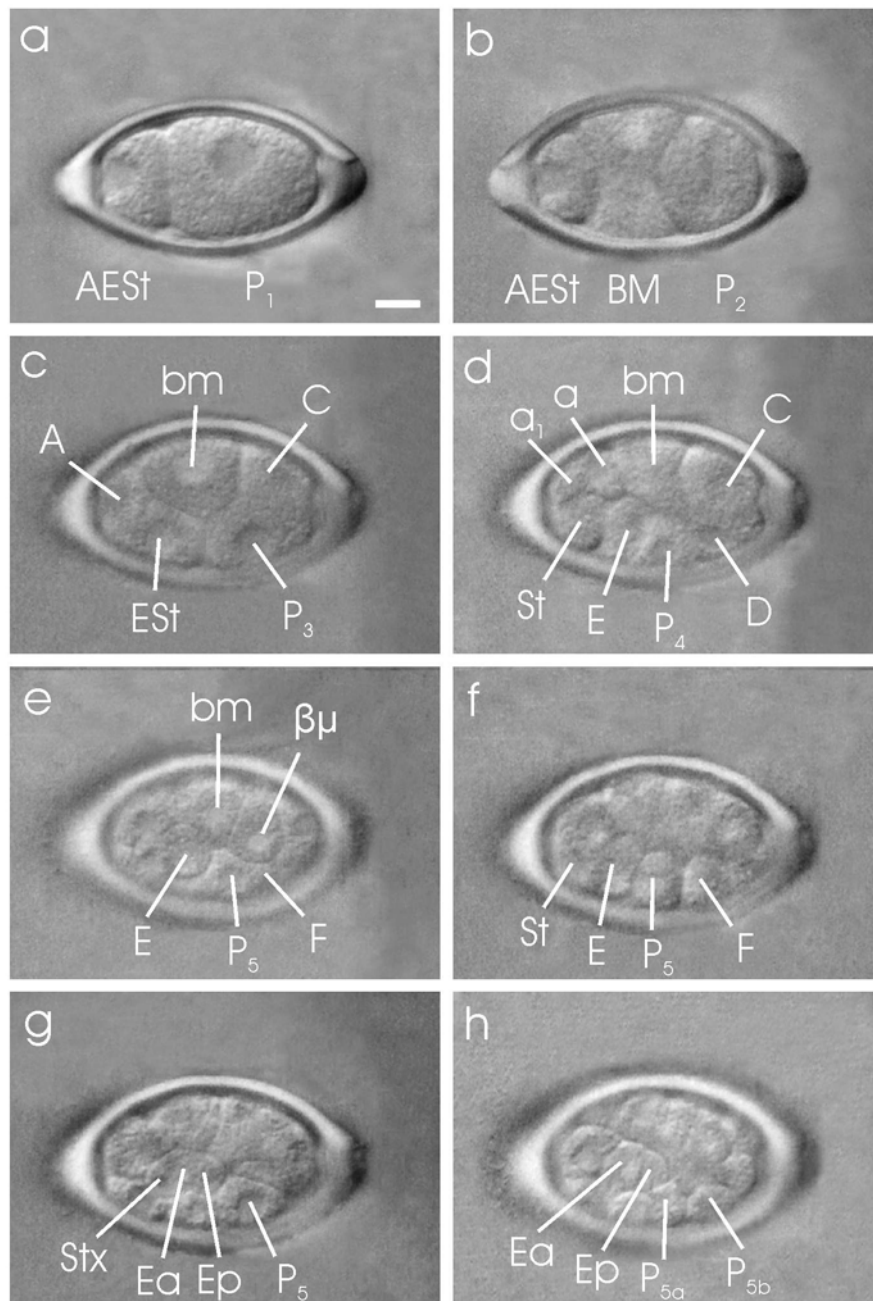


Abbildung 8.24: Embryonalstadien von *Trichuris muris*. (a) 2-Zellstadium, (b) 3-Zellstadium, (c) 6-Zellstadium, (d) 9-Zellstadium, (e) 22-Zellstadium, ventrale Fokusebene, (f) 22-Zellstadium, ca. zentrale Fokusebene, (g) Einwanderung der E-Zellen, ca. zentrale Fokusebene, (h) Einwanderung von E+ P₅-Töchter, ventrale Fokusebene. Nomarski-optik. Eichstrich: 10 μm

Das Teilungsverhalten von *T. muris* ist in Tabelle 10 festgehalten. Die jeweiligen Tochterzellen sind wegen der ungewohnten Benennung als Hilfestellung in einer eigenen Spalte aufgeführt.

<i>Trichuris muris</i>		
Zelle in Teilung	Zellstadium	Töchter
P ₀	2	P ₁ / AEst
P ₁	3	P ₂ / BM
AESt	4	Est / A
¹ BM ²	5	bm / βμ
P ₂	6	P ₃ / C
¹ A ²	7	a ₁ / a
Est	8	E / St
² BM ⁴	10	4BM
P ₃	11	P ₄ / D
¹ C ²	12	2C
² A ⁴	14	4A
¹ St ²	15	2St
¹ E ²	16	2E
⁴ BM ⁸	20	8BM
¹ D ²	21	2D
P ₄	22	P ₅ / F
² C ⁴	24	4C
⁴ A ⁸	28	8A
² E ⁴	30	4E
⁸ BM ¹⁶	38	16BM
² D ⁴	40	4D
P ₅	41	P _{5a} / P _{5b}
¹ F ²	42	2F
⁴ C ⁸	46	8C

Tabelle 10: Abfolge der frühen Zellteilungen bei *Trichuris muris*. Zur Vereinfachung sind Töchter einer Linie jenseits von 2 Mitgliedern nicht aufgeschlüsselt, sondern nach der Zelllinie benannt.

Bei dem sich sehr langsam entwickelndem *T. muris* zieht sich eine Zellteilung von ihrem Beginn bis zu ihrem Abschluß lange hin. Das heißt bevor eine Zelle ihre Teilung vollzogen hat, hat eine andere Zelle bereits mit ihrer Teilung begonnen. Dies ist der Fall bei den P₃-Nachkommen P₄ und D sowie in nächster Generation bei den P₃-Enkeln P₅, F und den beiden D-Töchtern. Sie alle teilen sich kurz nacheinander (Tabelle 10). Es ist deshalb nicht eindeutig, ob es sich bei diesen Teilungen der P₃-Enkel um eine gleichzeitige Teilung aller Mitglieder einer bestimmten Zelllinie handelt oder ob die Zellen verschiedene Zelllinien darstellen. Bei der Teilung von P₃ und P₄ entstehen jeweils gleich große Töchter mit dem gleichen Gehalt an Granula, was eher für gleichwertige Töchter und entgegen Malakhov *et al.* (1984) spricht. Das Verhalten der Zellen konnte leider nicht so weit beobachtet werden, als dass sich dadurch Hinweise auf die Zugehörigkeit ergäben.

Bei *C. elegans* bilden allein die Nachkommen der beiden Darmvorläufer E den Darm. Malakhov *et al.* (1984) nehmen für *T. trichiura* an, dass auch bei dieser Spezies der Darm aus E hervorgeht. Ob hier jedoch ausschließlich E-Nachkommen den Darm bilden wie bei *C.*

elegans oder ob auch andere Zelllinien beteiligt sind, wird nicht erwähnt. Bei *T. muris* zeigt sich bei höheren Proliferationsstadien ein stark abgegrenzter ovaler und sich später längender Bereich im Zentrum des Embryos, bei dem es sich um das Darmprimordium handelt. Er umschließt jedoch einen größeren Bereich als den, den die Nachkommen von E einnehmen, so dass an der Bildung des Darmes von *T. muris* wahrscheinlich noch andere Zelllinien als E beteiligt sind. Im Vergleich der zentralen mit der ventralen Fokusebene in Abbildung 8.24 g und h kann man evtl. eine Gastrulationsbewegung von Ea und Ep feststellen. In Abbildung 8.24 g wird ein kleiner ovaler Bereich aus einer St-Tochter (Stx) und Ea und Ep gebildet, so dass es sich bei dem Primordium von *T. muris* um ein Pharynx-Darm-Primordium handeln könnte.

Im Verlauf der weiteren Entwicklung zieht sich der Embryo kurz vor Ende der Proliferationsphase vom anterioren Eipol zurück. Gleichzeitig verliert die vordere Hälfte des Embryos einen Großteil seiner Granula zu Gunsten des Primordiums und der zuvor erwähnte abgegrenzte ovale Bereich im Zentrum des Embryos wird deutlich. Dieses Stadium von *T. muris* ähnelt sehr dem von *H. spumosa* in Abbildung 8.4 c.

Die Morphogenesestadien gleichen denen von *C. elegans*.

Die Embryogenese von *T. muris* schreitet sehr langsam voran. Schon die Vorkernverschmelzung bei Zimmertemperatur dauert ca. 41 h. Insgesamt dauert die Embryonalentwicklung bei 20° +/- 2° C ungefähr 50 Tage. Es findet kein Schlupf in der Außenwelt statt, sondern die infektiöse L₁ verbleibt im Ei bis zur Aufnahme durch den Wirt.

Die Eier von *T. muris* lassen sich über Monate gut im Kühlschrank bis zu deren Verwendung lagern, da wie bei *H. spumosa* keine Entwicklung bei 10° C und darunter stattfindet. Hohe Temperaturen (30° C) werden gut vertragen und beschleunigen die Embryogenese.

9 Diskussion

9.1 Besonderheiten der parthenogenetischen Reproduktion im Vergleich zum hermaphroditischen *C. elegans*

Durch das Fehlen von Spermien sind parthenogenetische Nematodenspezies gezwungen, eine Reihe von Herausforderungen der sehr frühen Embryogenese auf andere Weise zu überwinden als hermaphroditische oder getrenntgeschlechtliche Spezies. Es sind dies die Reduktionsteilung bzw. Mechanismen zur Erhaltung oder Wiedererlangung der Diploidie, die Aufhebung des Meioseblockes sowie die Eiaktivierung, die Induzierung der Polarität im Ei und die Etablierung der ersten Teilungsspindel.

Reduktionsteilung bei parthenogenetischen Spezies

Der Ablauf der Meiose unterscheidet sich nicht nur zwischen dem hermaphroditischen *C. elegans* (Kapitel 5.1.2) und parthenogenetischen Spezies, sondern ist auch bei den untersuchten parthenogenetischen Spezies *D. coronatus* und „*P. mekong*“ nicht einheitlich geregelt.

Wie *C. elegans* besitzt auch *D. coronatus* zwei Polkörper. Bei *D. coronatus* wird jedoch nur der erste Polkörper direkt vom Kern abgeschnürt. Der zweite Polkörper entsteht erst später durch Teilung des ersten, so dass beide Polkörper gleich viel Chromatin besitzen. (Kapitel 7.3.1). Der Kern bleibt diploid. Ein haploider Zustand tritt bei *D. coronatus* aller Wahrscheinlichkeit nach nicht auf. Die Reduktionsteilung wird also bei dieser Spezies nicht vollständig durchlaufen, sondern bricht ab, bevor eine Haploidie entsteht.

Das Fehlen von Spermien bei *D. coronatus* wird bei dieser Spezies also dadurch kompensiert, dass nur ein Schritt der Meiose abläuft. Eine Parthenogenese, bei der nur eine Reifeteilung abläuft, ist auch bei *Rhabditis aberrans*, *Rhabditis pellio* und *Rhabditis monohystera* nachgewiesen worden (Krüger, 1913; Hertwig, 1922; Belar, 1923).

In einem Fall konnte in einem 1-Zellstadium von *D. coronatus* eine ungewöhnliche meiotische Figur in Form eines „Doppelkerns“ beobachtet werden. Es scheint, als schnüre der Kern nach dem ersten Polkörper einen weiteren Polkörper ab (Abbildung 9.1). Die beiden „Kerne“ verschmelzen jedoch vor der ersten Teilung wieder. Anscheinend wird die Meiose II nicht in allen Embryonen vollständig unterdrückt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das ursprüngliche meiotische Programm (Miose I + Meiose II) noch vorliegt und nur der letzte Schritt, das Abschnüren des zweiten Polkörpers, unterbleibt.

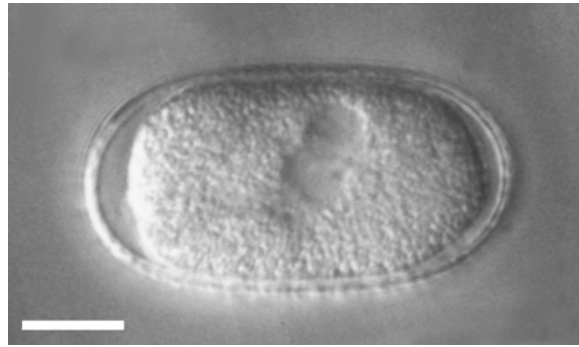


Abbildung 9.1: Vorübergehende meiotische Teilungsfigur („Doppelkern“) bei *D. coronatus* nach Bildung des ersten Polkörper. Anschließend erfolgt ein Wiederverschmelzen zu einem Kern. Nomarski Optik. Eichstrich: 10µm

Der Vorgang des Wiederverschmelzens von Kern und meiotischen Produkten ist von Sadler (2000; Lahl *et al.*, 2006) bei *A. nanus* beschrieben worden. Bei dieser Spezies wird aller Wahrscheinlichkeit nach der zweite Polkörper wieder in den Kern integriert. Auch hier wird die Meiose zunächst anscheinend vollständig durchlaufen.

Die Parthenogenese wird als eine abgeleitete Form von der ursprünglichen getrenntgeschlechtlichen Fortpflanzung angesehen (Siewing, 1980). Sie konnte inzwischen nicht nur bei Invertebraten oder Insekten, sondern auch bei Vertebraten nachgewiesen werden (Cole & Townsend, 1990). Möglicherweise ersetzte dabei zunächst der Hermaphroditismus die bisexuelle Fortpflanzung. Merospermie und Merogonie werden dabei als Übergangsformen angesehen (Czihak *et al.*, 1992). Bei Merogonie degeneriert der weibliche Kern und nur der männliche Anteil begründet den Kern des Embryos. Bei der Merospermie wird dagegen das Ei durch das Spermium nur aktiviert und erhält ein Centriol, es findet jedoch keine Verschmelzung der beiden Kerne statt und das Spermium wird abgebaut, ohne einen DNA-Beitrag geliefert zu haben. Bei echter Parthenogenese erfolgt die Aktivierung des Eies hingegen durch spermienunabhängige Mechanismen (Maupas, 1900; Krüger, 1913).

Eine parthenogenetische Fortpflanzungsweise birgt sowohl Vorteile als auch Nachteile gegenüber einer getrenntgeschlechtlichen Fortpflanzung. Eine kostenaufwendige Suche nach Geschlechtspartnern entfällt und es können in kurzer Zeit sehr viele gleiche Nachkommen produziert werden. Auf wechselnde Umweltbedingungen können getrenntgeschlechtliche Spezies jedoch durch ihre höhere Variabilität wesentlich schneller und effektiver reagieren. Bei manchen Spezies wie z. B. *Strongyloides ratti* (Viney, 1999) treten deshalb Generationswechsel zwischen parthenogenetischer und getrenntgeschlechtlicher Fortpflanzung auf. Die parthenogenetischen Weibchen befinden sich dabei im Darm des Wirtes und setzen drei unterschiedliche Sorten von Eiern ab, aus denen freilebende Weibchen, freilebende Männchen und wiederum parthenogenetische Weibchen entstehen.

Bei Hymenopteren tritt eine Form der induzierten Parthenogenese auf, die ebenfalls eine schnelle Umstellung der Fortpflanzungsweise ermöglicht. Dabei induzieren maternal vererbte symbiotische Bakterien eine parthenogenetische Entwicklung, bei der ausschließlich

Weibchen entstehen. Nach Antibiose wird die Parthenogenese aufgehoben und es werden sowohl Weibchen als auch Männchen gebildet (Stouthamer *et al.*, 1990; Zchori-Fein *et al.*, 1991).

Sadler (2000) fand auf alten Platten der hermaphroditischen Spezies „Herma-1“ (PS 1146) bisweilen Männchen. Anscheinend haben auch hermaphroditische Nematoden bei sich verschlechternden Umweltbedingungen die Möglichkeit, auf getrenntgeschlechtliche Fortpflanzung umzuschalten. Auch bei dem hermaphroditischen *C. elegans* erhöht sich die Anzahl der Männchen bei sich verschlechternden Umweltbedingungen.

Der bei manchen Individuen von *D. coronatus* vollständige Ablauf von zwei aufeinander folgenden Meiosen und das anschließende Wiederverschmelzen eines zweiten Polkörpers mit dem Kern (Abbildung 9.1) mag zum einen ein Überbleibsel seiner ursprünglichen Fortpflanzungsweise sein und ermöglicht durch einen einzigen Schritt ein leichtes Umschalten von Haploidie auf Diploidie. Zum anderen kann dadurch ein einfacherer Wechsel zwischen parthenogenetischer und getrenntgeschlechtlicher Fortpflanzung bei sich verschlechternden Umweltbedingungen ermöglicht werden, als wenn nach der ersten Meiose die Reduktionsteilung ganz abbrechen würde.

Im Einklang damit konnte in dieser Arbeit bei *D. coronatus* und bei einigen Tieren von „P. mekong“ eine Spermatheka-ähnliche Struktur nachgewiesen werden, die jedoch keine Spermien enthielt (Kapitel 7.2.1 und 7.2.2). Diese Struktur könnte, wie die Besonderheit bei der Meiose auf eine originäre bisexuelle Fortpflanzung hinweisen und, was sich nicht ausschließt, bei einer Umstellung auf eine ebensolche wieder genutzt werden. Auch Bird *et al.*, 1994 konnten eine Spermatheka-ähnliche Struktur bei einem australischen *A. nanus* aufzeigen.

Gould, 2002 interpretiert Eigentümlichkeiten, die im aktuellen embryologischen Kontext keinen Sinn machen, als Überbleibsel eines vergangenen Zustandes.

Anders als bei *D. coronatus* werden bei „P. mekong“ wie bei *C. elegans* beide Polkörper nacheinander vom Kern abgeschnürt, so dass der Vorgang jeweils mit einem Verlust von Kern-DNA einhergeht (Kapitel 7.3.2). Wird auch bei „P. mekong“ das originäre Programm einer vollständigen Meiose mit zwei Reduktionsteilungen durchlaufen, entsteht daraus ein haploides Individuum. Bei *C. elegans* arretieren haploide Eier jedoch in der 2. Hälfte der Embryogenese. Es wird angenommen, dass die massive Transkription, die in dieser Phase einsetzt, mit einem haploiden Genom nicht bewerkstelligt werden kann (Schierenberg & Wood, 1985). Die Wahrscheinlichkeit ist demnach größer, dass auch bei „P. mekong“ eine diploide Parthenogenese stattfindet. Auch entspricht die Größe des Oocytenkernes von „P. mekong“ ungefähr der Größe beider Vorkerne bei *C. elegans*, so dass angenommen werden kann, dass auch die Eier von „P. mekong“ vor der ersten Teilung einen diploiden Zustand erreichen (Lahl *et al.*, 2006).

Um trotz der Abschnürung der beiden Polkörper vom Kern einen diploiden Zustand zu erreichen, müssen Vorgänge stattfinden, die der Reduktion entgegenwirken. Zusätzliche Replikationsrunden vor der Meiose (prämeiotische Endoreduplikation) bzw. nach der Meiose (postmeiotische Endoreduplikation) könnten die Diploidie wieder herstellen. Ein einziges Mal

konnten bei „*P. mekong*“ Anzeichen einer postmeiotischen Endoreduplikation beobachtet werden. Dabei entstanden scheinbar zwei Kerne mit gerade so wenig Abstand zueinander, dass man sie als getrennte Strukturen erkennen konnte. Ein Kern befand sich dabei in einer Fokusebene mit den beiden Polkörpern, der andere in einer anderen Fokusebene (Abbildung 9.2). Vor der ersten Furchung verschmolzen die beiden Kerne zu einem.

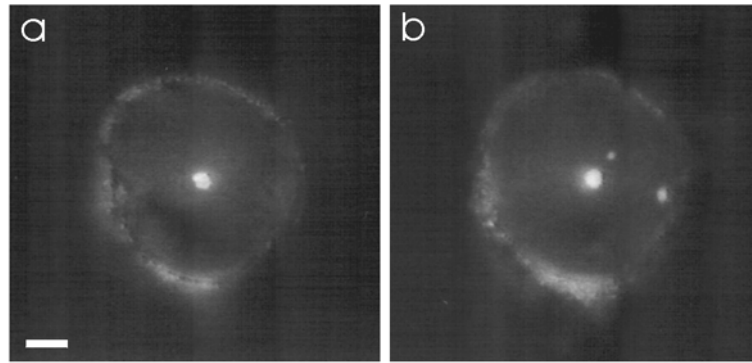


Abbildung 9.2: Bildung eines „Doppelkerns“ bei „*Plectus mekong*“. (a) 1. Fokusebene mit 1. Kern, (b) 2. Fokusebene mit 2. Kern und den beiden Polkörpern.
Nomarski-Optik. Eichstrich: 10µm

Die Umstellung auf eine parthenogenetische Fortpflanzungsweise und das Erreichen eines diploiden Zustandes haben *D. coronatus* und „*P. mekong*“ auf verschiedene Weise gelöst. Bei beiden Spezies gibt es noch Hinweise auf eine originäre bisexuelle Fortpflanzung. Dies spricht zusammen mit dem Auftreten der Parthenogenese in verschiedenen Taxa der Nematoden für eine mehrmalige, voneinander unabhängige Entstehungsweise der Parthenogenese (Schierenberg & Lahl 2004, Lahl *et al.*, 2006).

Eiaktivierung bei parthenogenetischen Spezies

Eine weitere Hürde, die bei Umstellung von getrenntgeschlechtlicher auf parthenogenetische Fortpflanzung überwunden werden muss, ist die Aktivierung des inaktiven Eies.

Vor der Aktivierung befindet sich das Ei im metabolischen Ruhezustand. Es wird keine DNA synthetisiert, RNA und Proteine nur mit sehr geringer Geschwindigkeit. Die Aktivierung kann durch eine Vielzahl von unspezifischen chemischen und physikalischen Vorgängen erfolgen (Alberts *et al.*, 1990). Beim hermaphroditischen *C. elegans* erfolgt die Aktivierung des in der Prophase der Meiose I arretierten Eies zusammen mit der Befruchtung durch das Spermium. Induziert durch das MSP des Spermiums wird die meiotische Oocytenreifung abgeschlossen und die beiden Vorkerne verschmelzen (Kapitel 5.1.2).

Bei parthenogenetischen Spezies fehlt das Spermium, um die Kaskade, die letztlich den Embryo für den Beginn der Embryogenese bereit macht, in Gang zu setzen. Obwohl der Begriff Eiaktivierung auch bei parthenogenetischen Spezies Verwendung findet, sind die Mechanismen, die einen Furchungsbeginn einleiten, noch nicht verstanden.

Bei *A. nanus* sind eine mechanische Verformung der Oocyte durch den Gonadenschlauch sowie eine Reintegration eines Polkörpers in den Kern als auslösende Faktoren für die Aktivierung diskutiert worden (Kutzowitz, 1993) (Kapitel 7.4). Auch Went & Krause, 1973 wiesen eine mechanische Verformung der Eier als aktivierenden Faktor bei einem Hymenopteren nach. In weiteren Arbeiten an *Pimpla turionellae* konnte eine Veränderung der inneren Eiarchitektur durch den Ovipositor als Aktivierungsursache verantwortlich gemacht werden, die zu einer Calciumfreisetzung aus intracellulären Speichern führt (Went & Krause, 1974a und 1974b; Went, 1982; Wolf & Wolf, 1988).

Bei *D. coronatus* und „P. mekong“ findet hingegen weder bei der Passage durch den Gonadenschlauch noch bei der Eiablage eine aktivierende, mechanische Verformung des Eies statt (Kapitel 7.4). Auch die Wiederaufnahme eines Polkörpers ins Genom ist bei beiden Spezies ausgeschlossen. Alle abgeschnürten Polkörper können auch bei mehrzelligen Embryonen nachgewiesen werden (Kapitel 7.3).

Durch die Untersuchungen an narkotisierten Tieren wird deutlich, dass die Aktivierung dieser beiden parthenogenetischen Spezies auf unterschiedliche Weise erfolgen muss. Während sich *D. coronatus* auch im Elterntier furcht, muss „P. mekong“ in die Außenwelt entlassen werden, um seine Embryogenese beginnen zu können. Sauerstoffpartialdruck, pH-Wert oder ähnliche Parameter könnten bei „P. mekong“ zur Aktivierung des Eies führen.

Der Wechsel der Umweltbedingungen als Voraussetzung für den Beginn der Embryogenese ist für mehrere Spezies nachgewiesen worden, unter ihnen *Parascaris equorum* (Boveri, 1899) und *Enoplus brevis* (Malakhov, 1994).

Polarisierung des Eies und Ausrichtung der anterior-posterior Achse

Aufgrund des Fehlens von Spermien, die bei *C. elegans* den frühen Embryo polarisieren und den posterioren Pol definieren, stellen sich bei parthenogenetischen Spezies die Fragen, wann bei ihnen eine sichtbare Polarität auftritt, ob sie konstant ausgerichtet ist und wie sie induziert wird. Vergleichend dazu wurde mit „Herma-1“ ein hermaphroditischer Cephalobide untersucht.

Wie bei *C. elegans* wird bei dem hermaphroditischen „Herma-1“ und den parthenogenetischen *A. nanus*, *D. coronatus* und „P. mekong“ (sowie bei allen untersuchten Plectiden) trotz des Fehlens von Spermien eine frühe Polarität dergestalt deutlich, dass eine große, anteriore, somatische AB-Zelle und eine kleine, posteriore Keimbahnzelle P₁ entstehen. „P. mekong“ muss in die Außenwelt entlassen werden, um seine Entwicklung beginnen zu können, so dass hier kein Bezug auf die Vulva als Richtungsanzeiger genommen werden konnte. Bei den anderen Spezies variierten sowohl Ausrichtung der Polarität als auch anteilmäßiges Verhältnis.

Bei *A. nanus* ist zu 97,6% und damit anders als bei *C. elegans* der anteriore Pol mit der AB-Zelle zur Vulva gerichtet. Wie schon im vorherigen Kapitel über die Eiaktivierung erwähnt, wird das Ei von *A. nanus* bei der Passage durch die Biegung des Gonadenschlauch stark verformt. Dies könnte eine Verschiebung von bis dato homogen im Cytoplasma verteilten

Faktoren mit sich bringen und so das Ei polarisieren. Ein erhalten gebliebenes mütterliches Centriol würde als größerer Bestandteil aufgrund der Passage durch die Engstelle dezentral an den von der Vulva entfernteren Pol des Eies verschoben werden und dort den posterioren Pol des Eies definieren. An dem der Vulva zugewandten Pol entstünde der anteriore Pol. Auf diese Weise käme ein entsprechendes Verhältnis der Ausrichtung zu stande.

Auch eine de novo Formation von Centriolen ist vorstellbar. Manandhar *et al.*, 1998 konnten bei Mäusen neben dem Verlust des weiblichen Centriols auch den Untergang des männlichen Centriols während der Spermatogenese nachweisen, so dass die Zygote zunächst völlig acentriolär ist. In den Oocyten konnten jedoch Gamma-Tubulin als ein Bestandteil von maternalem pericentriolarem Material und gewisse centrioläre Vorläufer gefunden werden, so dass eine de novo Synthese bei dieser Spezies angenommen wird (Calarco, 2000). Die de novo Synthese von Centriolen konnte auch bei normalerweise getrenntgeschlechtlichen Spezies (*D. melanogaster*, Seeigeln und Kaninchen) durch induzierte Parthenogenese mit künstlicher Aktivierung der Eier beobachtet werden (Kallenbach, 1983; Schatten *et al.*, 1986, 1992; Szöllosi & Ozil, 1991; Riparbelli & Callaini, 2003).

Bei *Acrobelloides* sp. („Herma-1“) zeigt in 72,2% der Fälle die große AB-Zelle zur Vulva. In 27,8% ist die Orientierung umgekehrt und die Keimbahn liegt der Vulva am nächsten. Trotz des Vorhandensein von Spermien ist die vorherrschende Richtung der Polarität der von *C. elegans* entgegengesetzt. Zusätzlich ist sie nicht so deutlich in eine Richtung ausgeprägt wie bei *C. elegans*.

Der Grund dafür könnte eine verlangsamte Eireifung gegenüber der von *C. elegans* sein. Gelängen die Eier von „Herma-1“ häufiger als bei *C. elegans* in einem für die Befruchtung unreifen Stadium in die Spermatheka, wären sie bei Erlangung der nötigen Reife bereits von allen Seiten von Spermien umgeben, so dass die Befruchtung von anderen Seiten als am späteren posterioren Pol erfolgen könnte. Es lägen Bedingungen vor, wie sie bei *C. elegans* für 2% der Fälle beschrieben worden sind, bei denen die AB-Zelle zur Vulva zeigt. Erreichen die Eier die Befruchtungsreife erst am Ende der Passage durch die Spermatheka, findet die Befruchtung nicht am eintretendem Pol statt, sondern erfolgt erst zu dem Zeitpunkt, zu dem das Ei die Spermatheka schon wieder verläßt, also am entgegengesetztem Pol. Auf diese Weise wäre entsprechend den Beobachtungen in der überwiegenden Zahl der Fälle die AB-Zelle zur Vulva gerichtet.

Denkbar und wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Spermien zwar vorhanden sind, aber nicht bei der Ausbildung der Polarität mitwirken. Es könnten so die gleichen Mechanismen wirken wie sie oben für *A. nanus* beschrieben wurden. Auf dem Weg zur Entwicklung einer parthenogenetischen Fortpflanzungsweise könnte bereits ein anderer Mechanismus (vgl. parthenogenetischer *A. nanus*) zur Etablierung der anterior-posterior Achse gefunden worden sein.

Zu dieser Annahme passende Beobachtungen machten Goldstein *et al.* 1998 bei der Ausrichtung der Polarität in Eiern von „Herma-1“. Nach ihren Untersuchungen besteht kein Zusammenhang zwischen dem Eintrittsort des Spermiums und der Ausrichtung der Polarität.

Anders als bei den in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen gaben Goldstein *et al.* zwar an, dass sich die AB-Zelle stets in Vulvanähe etabliert. Dies mag jedoch an der geringen Zahl der von ihnen untersuchten Tiere liegen. Sie konnten jedoch in keinem Fall Anzeichen für einen gerichteten cytoplasmatischen Fluss erkennen. Bei Untersuchung der P-Granula konnte nachgewiesen werden, dass sie auf andere Art und Weise, nämlich mit den Vorkernen bzw. Kernen assoziiert, asymmetrisch verteilt werden.

Bei *D. coronatus* zeigt sich, anders als bei den oben beschriebenen Spezies, keine vorherrschende Richtung der Polarität, sondern die Hälfte der Embryonen zeigt mit ihrem anterioren Pol zur Vulva, während die andere Hälfte mit der Keimbahnzelle zur Vulva ausgerichtet ist. Die Fixierung der anterior-posterior Achse scheint bei *D. coronatus* dem Zufall überlassen und unabhängig von einem äußeren Signal zu sein. Trotzdem muss es auch hier Mechanismen geben, die eine Asymmetrie ins Ei bringen. Engpässe im Gonadenschlauch wie bei *A. nanus* konnten bei *D. coronatus* jedoch nicht festgestellt werden.

Auch bei Plectiden tritt eine frühe Polarität in Form einer anterioren AB-Zelle und einer posterioren Keimbahnzelle auf. Kurz vor Abgabe des zweiten Polkörpers verlagern starke Cytoplasmaströmungen den Zellkern zu einem Pol, an dem dann der zweite Polkörper abgeschnürt wird (Kapitel 7.3.2). Was den Kern dazu veranlasst, eine derart asymmetrische Lage einzunehmen, ist unklar. Sie ist jedoch Ausdruck einer frühen Polarisierung des Eies. Nach Abgabe des zweiten Polkörpers und Wanderung des Zellkernes in die Mitte des Embryos folgt eine zweite Welle von starken Cytoplasma-Umwälzungen und Rotationen des Embryos, so dass keine Korrelation eines späteren Pols des Embryos mit dem Areal, in dem die Abschnürung des zweiten Polkörpers erfolgte bzw. der dabei randständigen Lage des Zellkernes hergestellt werden kann. Es besteht die Möglichkeit, dass bei den untersuchten Plectiden der Kern der Oocyte die Funktion eines männlichen Vorkerns hinsichtlich der Etablierung der anterior-posterior Achse übernimmt.

Bei *C. elegans* kann auch die meiotische Spindel unter bestimmten Bedingungen eine Polarität induzieren (Wallenfang & Seydoux, 2000). Dies könnte aufgrund der sehr randständigen Lage bei der zweiten Polkörperabschnürung auch bei Plectiden gelten.

Goldstein *et al.* (1998) konnten bei ihren Untersuchungen nur zwei verschiedene Muster der Achsenausprägung erkennen. Bei den meisten untersuchten Spezies orientierte sich die anterior-posterior Achse abhängig vom Spermieeintrittsort wie bei *C. elegans*. Bei den Cephalobina jedoch zeigte sich eine umgekehrte, spermienunabhängige Richtung, auch wenn Spermien vorhanden waren. Die Autoren schließen daraus, dass der Mechanismus der Achsenausrichtung bei den Cephalobina gegenüber dem Muster bei *C. elegans* evolviert ist.

Die hier gemachten Untersuchungen zeigen jedoch mit „Herma-1“ (wie *A. nanus* Cephalobide) und *D. coronatus* (Rhabditide) Abweichungen hinsichtlich des Verteilungsmusters der anterior-posterior Achse. Trotz der Unabhängigkeit von Spermien konnte auch bei dem verwandtschaftlich *C. elegans* nahestehenden *D. coronatus* in der Hälfte der Fälle eine umgekehrte Orientierung wie die von *C. elegans* gezeigt werden.

Die Hürden, vor denen parthenogenetische Spezies aufgrund des Fehlens von Spermien stehen, werden auch von nah verwandten Spezies auf unterschiedliche Weisen überwunden, was für ein mehrmaliges, voneinander unabhängiges Entstehen der Parthenogenese bei den Nematoda spricht.

9.2 Unterschiede in der Etablierung der Zelllinien bei Vertretern verschiedener Claden

Claden III bis V und PCM-Gruppe (zwischen Clade II und III positioniert)

Bei *D. coronatus*, *Protorhabditis* DF 505, *Rhabditis* sp., *A. nanus*, „Herma-1“, den Plectiden, *T. lirellus* sowie den parasitären Nematoden *H. spumosa*, *N. dubius* und *N. brasiliensis*, alle Mitglieder der Claden III bis V plus der PCM-Gruppe (Plectiden, Chromadoriden, Monhysteriden), findet wie bei *C. elegans* eine frühe Keimbahn-Soma-Trennung statt und es spalten sich die gleichen Gründerzellschicksale von der jeweiligen Keimbahnzelle ab. Insbesondere die parasitären Spezies von Clade III bis V zeigten keine ihnen eigene Abweichungen in der Etablierung der Zelllinien und der räumlichen Musterbildung.

Die frühe Musterbildung ist, bis auf das vorübergehende lineare 4- bis 5-Zellstadium bei *D. coronatus* und die auf einen kurzen Zeitraum des Auftretens beschränkten individuellen Variationen bei *A. nanus* und *D. coronatus*, sehr ähnlich. Aus diesen kurzen Phasen der Verschiedenartigkeit ergibt sich jedoch vor allem bei *D. coronatus* zwangsweise eine andere Art und Weise der Zellspezifikaktion (Kapitel 9.3.1).

Die Reihenfolge der weiteren Zellteilungen kann von Spezies zu Spezies gravierend variieren. Skiba & Schierenberg (1992) konnten einen Zusammenhang zwischen der Teilung der Keimbahn und der Entwicklungsgeschwindigkeit für bestimmte Spezies, unter ihnen *A. nanus* (Clade IV), nachweisen. Je langsamer die Embryogenese ablief, desto relativ früher teilte sich die Keimbahn. Bei sich schnell entwickelnden Spezies entstand die Keimbahnzelle P₄ erst im 24-Zellstadium, wogegen in einigen *Acrobeloides*-Spezies P₄ schon im 5-Zellstadium existierte, bevor sich irgendeine somatische Gründerzelle geteilt hatte (Schierenberg, 1997 a).

Experimente an *C. elegans*, bei denen die Zellteilungen künstlich verzögert wurden, führten zu einer reduzierten Anzahl von Keimbahnteilungen (Schlicht & Schierenberg, 1991). Offensichtlich müssen die Teilungen der Keimbahn und damit die Trennung vom Soma in einem gewissen Zeitfenster abgelaufen sein, um die Keimbahnqualität zu erhalten.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Nematoden trifft die Abhängigkeit der P₄-Entstehung von der Entwicklungsgeschwindigkeit jedoch nicht immer zu. *D. coronatus* entwickelt sich zwar recht langsam und passend dazu entsteht P₄ schon im 8-Zellstadium. Bei dem sich wesentlich langsamer entwickelnden *H. spumosa* (Clade III) wird P₄ aber ebenso wie bei den untersuchten Plectiden (PCM-Gruppe) (Ausnahme „P. mekong“), dem sich ähnlich schnell wie *C. elegans* entwickelnden *N. brasiliensis* (Clade V) und dem etwas langsameren

N. dubius (Clade V) wie bei *C. elegans* (Clade V) zwischen dem 14- und 16-Zellstadium gebildet.

Mitglieder von Clade I und Clade II entwickeln sich deutlich anders.

Clade II

Die Etablierung der Zelllinien bei Clade II weicht sehr stark von dem der Nematoden der Claden III bis V plus der PCM-Gruppe ab.

Bei den wenigen Spezies von Clade II, die bis jetzt untersucht wurden, zeigten sich keine frühen asymmetrischen Zellteilungen (Malakhov, 1994; Voronov & Panchin, 1998; Voronov, 1999; Voronov *et al.*, 1998; Schierenberg, 2001, 2004). Alle Blastomeren sahen gleich aus, teilten sich gleichzeitig und nahmen variable Positionen innerhalb des Embryos ein. Es konnten weder räumliche Achsen noch bestimmte Zelllinien definiert werden. Auch konnte bis jetzt keine offensichtliche Keimbahn erkannt werden. Bei *E. brevis* (Voronov & Panchin, 1998) und *Pontonema vulgare* (Voronov *et al.*, 1998) konnte erst im 8-Zellstadium reproduzierbar eine Blastomere mit einem langsameren Teilungsrhythmus ausgemacht werden. Es handelt sich dabei um die Darmvorläuferzelle, die einzige bis jetzt identifizierte Zelllinie.

Experimente mit partiellen Embryonen und solche, bei denen einzelne Blastomeren farblich markiert wurden, zeigten, dass die Blastomeren erst wesentlich später ein individuelles Schicksal annehmen und zu einer gewissen Regulation fähig sind (Voronov & Panchin, 1998).

T. diversipapillatus, Vertreter des Enoplida-Schwertertaxons Triplonchida und ebenfalls Mitglied der Clade II zeigt hinsichtlich der frühen Zellteilungen eine starke Ähnlichkeit mit *E. brevis*. Auch hier kommen keine asymmetrischen Teilungen vor. Zelllinien oder eine Keimbahn konnten nicht erkannt werden. Alle Blastomeren sehen gleich aus. Im 4-Zellstadium treten verschiedene räumliche Anordnungen auf (Schierenberg, 2005). Ähnliches ist auch für *P. vulgare* beschrieben worden (Malakhov, 1994; Voronov, 1999).

Neuste, noch nicht publizierte Ergebnisse aus dem Zoologischen Institut, Köln (E. Schierenberg, persönliche Mitteilung) zeigen aber, dass es auch in dieser Clade Vertreter mit reproduzierbaren Zellstammbäumen gibt (Triplonchida, Abbildung 4.2). Die Zellteilungen sind allerdings nicht von Anfang an asymmetrisch und zeitlich gestaffelt. Sie entsprechen somit dem Muster bei Vertretern von Clade I.

Clade I

Auch die Spezies der Clade I weichen von der Art und Weise, wie Zelllinien bei den Claden III bis V plus der PCM-Gruppe etabliert werden, sehr deutlich ab. Malakhov *et al.* (1984)

beschrieben die frühen Teilungen von *T. trichiura*. Der in dieser Arbeit untersuchte *T. muris* ähnelt diesem Teilungsverhalten sehr (Kapitel 8.6.2).

Demnach existieren bei *T. muris* andere und insgesamt mehr somatische Gründerzellen. Auch die Verteilung der Zellschicksale auf die Blastomeren erfolgt bei dieser Spezies anders als bei den bisher untersuchten Nematoden. Die Abspaltung einer Zelle von der Keimbahn, die drei somatische Entwicklungsschicksale (A, E, St) beinhaltet, tritt bei Mitgliedern der Claden III bis V plus der PCM-Gruppe nicht auf. Auch kommt bei *T. muris*, anders als bei den anderen Nematoden, das Darmschicksal (E-Zelle) von der anterioren, kleineren Zelle des 2-Zellstadiums. Die bis auf die erste Teilung fehlenden, asymmetrischen Zellteilungen sind ein weiterer Unterschied in der Etablierung der Zelllinien und erschweren es, Zellen einer bestimmten Zelllinie zuzuordnen.

Auffällig ist bei *T. muris* auch die anhaltende Teilungsaktivität der als Keimbahnzelle bezeichneten P_4 . Bei *D. coronatus* tritt zwar eine im Vergleich zu *C. elegans* verfrühte Teilung der Keimbahnzelle P_4 auf. Bei *T. muris* teilt sich aber die Keimbahn darüber hinaus weiter. Unklar ist der Schicksalscharakter der P_3 - Nachkommen P_4 und D sowie in nächster Generation der P_3 -Enkel P_5 , F und der beiden D-Töchter. Sie alle teilen sich kurz nacheinander, so dass nicht eindeutig ist, ob es sich bei diesen Teilungen um die gleichzeitige Teilung aller Mitglieder einer Zelllinie handelt oder ob sie Zellen verschiedener Zelllinien darstellen.

Es treten jedoch auch von *C. elegans* und anderen Nematoden bekannte embryologische Vorgänge bei *T. muris* auf. Es sind dies die Polaritätsumkehr bei der Teilung von P_2 und der so ermöglichte Kontakt der als Keimbahn bezeichneten Zelle zur ESt- bzw. E-Zelle. Die Gastrulation zeigt sowohl von anderen Nematoden bekannte Züge als auch Unterschiede zu ihnen (Kapitel 8.6.2 und 9.4.1).

Ein weiterer in dieser Arbeit untersuchter Vertreter von Clade I ist *T. spiralis* (Kapitel 8.5.2). Bei dieser Spezies findet eine vollkommen andere Musterbildung als bei den bisher untersuchten Spezies statt. Obwohl der Charakter der Zellen unklar ist und auch der Ablauf der Teilungen nicht beobachtet werden konnte, wird doch deutlich, dass hier eine völlig andere Zellschicksalsverteilung und ein anderes Zellverhalten stattfinden müssen. Es kommt zu einer zentralen Hohlraumbildung mit Einwanderung einer Zellpopulation, auf die im Kapitel 9.4 eingegangen wird. Einzig das 2-Zellstadium ähnelt in seiner starken Asymmetrie dem von *T. muris*. Damit unterscheidet sich *T. spiralis* noch gravierender von Mitgliedern der Claden III bis V plus der PCM-Gruppe als *T. muris*.

Der ebenfalls zu Clade I gehörende *Prionchulus* sp. teilt sich hingegen bei der ersten Teilung symmetrisch in zwei gleich große Tochterzellen. Auch die nächste Teilung jeder Tochterzelle ist symmetrisch und transvers, so dass das 4-Zellstadium aus vier gleich großen Blastomeren besteht. Erst im 8-Zellstadium hat sich eine Zelle asymmetrisch geteilt (Schierenberg, 2006). Auch *Dorylaimus* sp. (Clade I) zeigt nicht von Beginn an asymmetrische Teilungen, sondern erst nach dem 4-Zellstadium (Schierenberg & Lahl, 2004).

Allen bisher untersuchten Vertretern von Clade I und II ist gemeinsam, dass sie hinsichtlich der frühen Zellteilungen und der Etablierung von Zelllinien deutlich von den Mitgliedern von Clade III bis V plus der PCM-Gruppe abweichen. Den Angehörigen von Clade I und II fehlen frühe asymmetrische Teilungen, die bei Angehörigen der anderen Claden zur frühen Keimbahn-Soma-Trennung und zur Etablierung der Keimbahn bzw. von somatischen Zelllinien führen. Bei den Angehörigen von Clade I folgen zwar später asymmetrische Teilungen (*T. muris*, *T. spiralis*, *Prionchulus* sp., *Dorylaimus* sp.), bei einigen Mitgliedern von Clade II (Enoplida) scheinen sie jedoch völlig zu fehlen.

9.3 Unterschiede in der frühen Musterbildung und Zellspezifikation bei nahverwandten Nematodenspezies

9.3.1 Das lineare Stadium von *D. coronatus* und *Protorhabditis* sp.

Im Unterschied zu *C. elegans* sind die frühen Blastomeren von *D. coronatus* und *Protorhabditis* sp. vorübergehend linear angeordnet. Die Anordnung ergibt sich durch eine zusätzliche Centrosomen-Kern-Rotation in der AB-Zelle (Kapitel 7.5.2.2) und einer anschließenden anterior-posterioren Teilungsrichtung. Bei *C. elegans* findet diese Centrosomen-Kern-Rotation nur in der Keimbahnzelle P₁ statt (Hyman & White, 1987; Hyman, 1989), so dass sich hier eine rhomboide Anordnung ergibt. Das gleiche Muster wie *C. elegans* zeigen Plectiden und Cephalobiden (Kapitel 7.5.2.1).

Wie entsteht die lineare Anordnung der frühen Blastomeren?

Im Zusammenhang mit der Kern-Centrosomen-Rotation bei *D. coronatus* konnten angrenzend an die posteriore Membran von AB und die anteriore Membran von P₁ granulafreie Bereiche beobachtet werden.

Es könnte sich hierbei um Ansatzpunkte für Mikrotubuli handeln wie sie Hyman (1989) bei *C. elegans* beschrieb. Hyman konnte die Bildung eines granulafreien Bereichs angrenzend an die anteriore Membran von P₁ in der Region nachweisen, in der die Mikrotubuli vom Centrosom ausgehend um eine Ansatzstelle konkurrieren. Der Anheftungspunkt wird als "cortical indentation" bezeichnet und könnte aus dem midbody der ersten Teilung resultieren. Falls diese Struktur eine Voraussetzung oder ein Nebeneffekt der Kern-Centrosomen-Rotation ist, sollte man sie in beiden Zellen von *D. coronatus* wie beobachtet finden.

*Die zusätzliche Kern-Centrosomen-Rotation in der AB-Zelle von *D. coronatus* ist ein autonomer Prozess.*

Da Hutter & Schnabel (1995) zeigen konnten, dass bei *C. elegans* die P₁ eine anterior-posterior Polarität in der AB-Zelle induziert, besteht die Möglichkeit dass zusätzlich eine Kern-Centrosomen-Rotation durch die Keimbahnzelle herbeigeführt wird. Um dies zu testen,

wurden Ablations- und Eliminationsexperimente der P_1 bei beiden Spezies durchgeführt und das Verhalten der AB beobachtet.

Weder bei *C. elegans* noch bei *D. coronatus* konnte durch Ablation der P_1 -Zelle eine Veränderung der Spindelorientierung in AB herbeigeführt werden. Experimente mit vollständiger Entnahme der P_1 schlossen eine Einflussnahme einer abgetöteten P_1 bei beiden Spezies aus. Sowohl die transverse Ausrichtung der AB-Zellspindel in *C. elegans* als auch die longitudinale Ausrichtung der AB-Zellspindel von *D. coronatus* sind demnach zellautonome Prozesse, die keiner Zellinduktion durch die Nachbarzelle P_1 bedürfen.

ABa und ABp sind bei D. coronatus unterschiedlich. Ein Kontakt zwischen ABp und der Keimbahn ist nicht nötig.

Eine der frühen Induktionen bei *C. elegans* ist die kontaktvermittelte Induktion der ABp durch die Keimbahnzelle P_2 . Zunächst besitzen die beiden AB-Töchter noch das gleiche Entwicklungspotential (Priess & Thomson, 1987). Im rhomboid angeordneten 4-Zellstadium wird dann jedoch nur die ABp, nicht aber die ABa von der Keimbahnzelle berührt. Dadurch verliert die ABp die Fähigkeit, auf spätere Signale zu reagieren. Das Ergebnis ist ein verändertes Differenzierungsmuster der ABp gegenüber der ABa (Bowerman *et al.*, 1992). Aus der ABa gehen im Gegensatz zur ABp Teile des Pharynx hervor, wohingegen von ABp Exkretionssystem und Rectum sowie die beiden "intestinal rectal valve cells" gebildet werden.

Im Unterschied zu *C. elegans* berührt die P_2 bei *D. coronatus* niemals ABp und nur in der Hälfte der Fälle haben P_3 und AB-Töchter Kontakt zueinander (Abbildung 7.28). Es stellt sich die Frage, ob ABa und ABp trotz nicht stattfindender Induktion ein voneinander unterschiedliches Differenzierungsprogramm durchlaufen wie bei *C. elegans*.

Untersuchungen der Zellzykluslänge zeigten, dass ABp sich nach kürzerer Zeit wieder teilt als ABa und somit wahrscheinlich eine Aufspaltung in zwei Zelllinien erfolgt ist. Der Unterschied beläuft sich auf 5-7min ($n=6$, 2x 5min, 2x 6min, 2x 7min). Des Weiteren besitzt *D. coronatus* vier IVC. Bei *C. elegans* stammen IVC von ABp.

Ein weiteres Kriterium für die unterschiedliche Differenzierung von ABa und ABp liefert ein Vergleich der räumlichen Musterbildung in den von ihnen abstammenden Klonen. Im 128-AB-Zellstadium zeigen die Blastomeren von *C. elegans* und *D. coronatus* eine erstaunlich gleichartige räumliche Anordnung. Besonders augenscheinlich ist bei beiden Spezies die Aufspaltung der ABar-Nachkommen in zwei distinkte Klone. Weitere Untersuchungen ergaben die Beteiligung von AB-Zellen von *D. coronatus* bei der Bildung von Hypodermis, Neuronen und Pharynx wie bei *C. elegans* (eingereicht Lahl *et al.*, 2007).

Zusätzlich wurde das Schicksal einzelner Blastomeren von *D. coronatus* untersucht ($n=2$), die in *C. elegans* einen klonspezifischen, programmierten Zelltod in nur einem Klon (ABa- oder ABp-Nachkommen) erleiden. Es handelt sich dabei um die Zellen ABalapaapaa, ABalappaapaa, ABalppaapaa und Abarpaapaa sowie um ihre genealogischen Entsprechungen unter den ABp-Nachkommen ABplapaapaa etc. Bei *C. elegans* durchlaufen die vier

genannten ABa-Nachkommen eine Apoptose, die korrespondierenden ABp-Zellen jedoch nicht (Sulston *et al.*, 1983). Bei *D. coronatus* führen diese ABa-Nachkommen ebenfalls einen programmierten Zelltod aus, während die entsprechenden ABp-Nachkommen dies nicht tun, sondern mindestens eine weitere Teilung durchlaufen, bevor sie sich differenzieren (eingereicht Lahl *et al.*, 2007).

Der Nachweis des unterschiedlichen Entwicklungsprogramms in Teilen des ABa-Klons gegenüber Teilen des ABp-Klons sowohl in *C. elegans* als auch in *D. coronatus* demonstriert die Verschiedenartigkeit der ABa- gegenüber der ABp-Linie.

Wie werden ABa und ABp unterschiedlich voneinander?

Da eine kontaktvermittelte Induktion durch die Keimbahn wie bei *C. elegans* nicht in allen Mustervarianten von *D. coronatus* möglich ist, stellt sich die Frage, auf welche Weise ABa und ABp unterschiedlich voneinander werden.

Eine Möglichkeit der Polarisierung der AB-Zelle ist durch die benachbarte Keimbahnzelle gegeben. Im 2-Zellstadium kontaktiert die Keimbahnzelle P₁ immer die AB-Zelle, so dass bereits zu diesem frühen Zeitpunkt, also vor der Entstehung der ABp, eine Induktion erfolgen könnte. Durch den Kontakt könnte die AB-Zelle entlang ihrer Längsachse polarisiert werden. Auf diese Weise könnten sich cytoplasmatische Komponenten ähnlich den P-Granula bei *C. elegans* (Strome & Wood, 1983; Strome, 1986) an einem Pol anhäufen und der posteriore Bereich würde gegenüber dem anterioren Teil der AB-Zelle verändert werden. Durch die folgende Teilung der AB-Zelle entstünden dann die unterschiedlich determinierten Tochterzellen ABa und ABp. Eine spätere Induktion der ABp wäre nicht mehr nötig. Hutter & Schnabel (1995 a, b) konnten bei *C. elegans* eine Induktion der AB entlang ihrer anterior-posterior Achse durch P₁ nachweisen.

Auffällig ist die anteriore, zu ABa gerichtete Lage des EMS-Zellkernes während und kurz nach der Reorganisation des linearen Stadiums (Kapitel 7.5.2.4). Vielleicht handelt es sich hier um eine aktive Kontaktaufnahme der EMS zu ABa mit induzierendem Charakter. Dabei könnte entweder die EMS-Zelle selbst ABa induzieren, unterschiedlich von ABp zu werden, oder das Signal der P₂ würde über die EMS-Zelle an ABa weitergereicht. Die EMS-Zelle hätte dann die Funktion eines Vermittlers.

Die Verlagerung von Kernen an den Cortex wurde bei *C. elegans* als Zeichen einer stattfindenden Induktion des Darmvorläufers durch die Keimbahnzelle P₃ interpretiert (Schierenberg, 1987).

Welchen Vorteil bietet ein unterschiedlicher Mechanismus der ABa-/ABp-Spezifizierung?

Die Art und Weise des Unterschiedlichwerdens der ABp gegenüber der ABa wurde bei *D. coronatus* und *C. elegans* auf anders geartete Weise gelöst.

Untersuchungen an verschiedenen Spezies haben gezeigt, dass unterschiedlich eingeschlagene embryologische Wege im Wesentlichen zum selben Resultat führen (Schierenberg, 2001; Houthoofd *et al.*, 2006).

Da auf den Blastomeren von *D. coronatus* anscheinend kein evolutiver Druck lastete, einen Kontakt zwischen ABp und P₂ herstellen bzw. aufrecht erhalten zu müssen, konnte sich bei dieser Spezies eine andere räumliche Anordnung als bei *C. elegans* entwickeln. Erst die Etablierung der dorso-ventralen Achse lässt sich nicht mehr mit einer linearen Anordnung vereinbaren, so dass eine Reorganisation in eine rhomboide Anordnung erfolgt. Die lineare Anordnung der Blastomeren und die spätere Reorganisation scheinen zunächst ein evolutiver Nachteil gegenüber anderen Nematoden zu sein, die keine zeitaufwendige Umstrukturierung durchlaufen müssen. Andererseits bietet gerade die Unabhängigkeit von einer Induktion und damit von einer strikten Zellanordnung einen Spielraum für andersgeartete evolutive Erprobungen und das Auffinden von Nischen. So wird durch die Art und Weise, dass AB-Schicksal zu spezifizieren das Entwicklungsprogramm dergestalt vereinfacht, dass weniger Zell-Zell-Interaktionen notwendig sind.

Da das lineare Stadium auch bei anderen Spezies beobachtet werden kann (Malakhov, 1994), stellt sich die Frage, ob es sich hierbei um ein ursprüngliches oder um ein abgeleitetes Merkmal handelt. Dolinski *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die lineare Anordnung der frühen Blastomeren in verschiedenen Taxa auftritt. Unter Verwendung von outgroup comparisons schlossen sie, dass die rhomboide Anordnung innerhalb der Rhabditida ursprünglich gegenüber der linearen Anordnung ist und sich so unabhängig voneinander in verschiedenen Zweigen der Nematoda entwickelt haben muss.

9.3.2 Die Reorganisation des linearen Stadiums bei *D. coronatus*

Durch die Umwandlung der linearen Anordnung in ein zweischichtiges, rhomboides Muster wie bei *C. elegans* erfolgt die Etablierung der dorso-ventralen Achse sowie der rechts-links Achse und es werden die Voraussetzungen für eine spätere Gastrulation geschaffen. Dabei drehen sich ABp und EMS um 90° umeinander. Die Positionen der anderen Zellen verändert sich nicht. (Kapitel 7.5.2.4).

Um herauszufinden, ob ABp und EMS gleichermaßen oder nur eine der beiden Zellen bei der Verschiebung aktiv ist, wurden jeweils ABp und EMS in verschiedenen Versuchen ablatiert. Es konnte gezeigt werden, dass EMS die aktive Zelle bei der Reorganisation des linearen in ein rhomboides Muster ist (Kapitel 7.5.2.4.1).

Die Kompetenz zur Migration der EMS beruht wahrscheinlich auf Heterochronie.

Die aktive Wanderung der EMS lässt sich am einfachsten mit einer Verschiebung der zeitlichen Ereignisse erklären.

Die Wanderung der Darmvorläuferlinie tritt bei *C. elegans* normalerweise erst nach Abspaltung des MS-Schicksals und nachfolgender Teilung der E-Zelle in zwei Zellen im Zuge der Gastrulation auf (Junkersdorf & Schierenberg, 1992; Nance & Priess, 2002). Durch

künstliche Verzögerung der Teilungsaktivität von E konnte nachgewiesen werden, dass die Fähigkeit zur Wanderung bei *C. elegans* nicht an das Vorliegen von zwei Zellen geknüpft ist. Auch die E-Zelle als einzelne Zelle besaß schon die Fähigkeit zur Einwanderung (Kapitel 7.7.4) (Lahl *et al.*, 2003). Damit sind Zellzahl und Migrationsfähigkeit bei *C. elegans* unabhängig voneinander.

Plectiden (Lahl *et al.*, 2003) und einige andere Nematoden (Malakhov, 1994; Voronov & Panchin, 1998) zeigen die frühe Einwanderung nur einer E-Zelle im Verlauf der Gastrulation sogar unter natürlichen Bedingungen eine Generation früher (Kapitel 7.7.2). Bei *D. coronatus* erfolgt die Befähigung zur Wanderung offensichtlich noch eine Generation früher zu einer Zeit, zu der EMS noch vorliegt bzw. benachbarte Zellen ermöglichen die Migration durch frühzeitige Expression von entsprechenden Zelloberflächenmolekülen. Die zwischen den einzelnen Spezies zeitlich verschobene Fähigkeit zur Wanderung der EMS bzw. der Darmvorläufer scheint dabei einer Heterochronie zu unterliegen. Heterochronie wird oft als der wesentliche Faktor für evolutionäre Veränderungen bezeichnet (Raff, 1996).

9.3.3 Varianten in der frühen räumlichen Musterbildung von *D. coronatus*

Mit der Teilung von P₂ und P₃ entstehen nach dem gleichen Prinzip verschiedene Varianten in der räumlichen Musterbildung. Durch Drehung der Teilungsspindel aus ihrer ursprünglich anterior-posterioren Ausrichtung heraus können die jeweiligen Nachkommen P₃ und C bzw. P₄ und D verschiedene Positionen zueinander und zur ventral gelegenen EMS-Zelle einnehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Position der P₄ von der individuellen Schalenlänge und Drehrichtung sowie dem Grad der Drehung der Teilungsspindeln von P₂ und P₃ abhängig ist. P₄ wird dabei in direkter Nachbarschaft zu EMS, in maximaler Entfernung von EMS oder in Zwischenpositionen etabliert (Kapitel 7.6.1.1). Unabhängig von der Lage, die P₄ zunächst einnimmt, wird bei allen Varianten früher oder später ein Kontakt zwischen der Keimbahnzelle P₄ und der Darmvorläuferzelle E vor deren nächster Teilung etabliert. Anschließend teilt sich die P₄ in scheinbar gleichwertige Töchter mit Keimbahncharakter (Kapitel 7.6.1.2). Eine Polaritätsumkehr wie bei *C. elegans* fehlt bei *D. coronatus*.

Warum nimmt P₄ Kontakt zur E-Zelle auf?

Da bei *D. coronatus* immer ein Kontakt zwischen der Keimbahnzelle P₄ und E beobachtet werden konnte, ist anzunehmen, dass diese Formation wichtig für die weitere Entwicklung ist. Dabei scheint es sich um eine aktive Wanderung der P₄ zur E-Zelle zu handeln. Als Voraussetzung muss zumindest die Keimbahnzelle in der Lage sein, ihre aktuelle Position wahrzunehmen und auf äußere Signale zu reagieren, um ihre endgültige Lage neben E einnehmen zu können.

Die Migration von P₄ gleicht die bei *D. coronatus* fehlende Polaritätsumkehr aus, bei der bei *C. elegans* die jeweils neu entstehenden Keimbahnzellen P₃ und P₄ anterior von ihren somatischen Schwesterzellen (C bzw. D) (zur Strassen, 1959; Schierenberg, 1987 b; Skiba

& Schierenberg, 1992; Laugsch & Schierenberg, 2004) etabliert werden und so automatisch ein Kontakt zwischen der Darmvorläuferlinie E und der Keimbahnzelle P_4 entsteht.

Auch bei allen anderen untersuchten Nematoden bis auf *T. spiralis*, bei dem die Keimbahn unklar bleibt, besteht ein Kontakt der Keimbahnzelle(n) zur Darmvorläuferzelle kurz vor Beginn der Gastrulation. Während der Gastrulation bleibt diese Verbindung bestehen und die Keimbahn folgt der E-Linie als zweite Zelllinie ins Zentrum. Die Polaritätsumkehr kann als eine Art Abkürzung interpretiert werden, bei der zeitaufwändige Zellwanderungen der Keimbahnzelle vermieden werden.

Für *C. elegans* wurde spekuliert, dass die Keimbahn von den großen und granularen Darmzellen ernährt werden könnte. Der Transport von Dotter aus den Darmzellen in die Oocyten zu einem späteren Zeitpunkt ist zumindest nachgewiesen worden. Um diesen Transport gewährleisten zu können, ist eine direkte Nachbarschaft Voraussetzung. Bei *C. elegans* sind lange Zellausläufer von Z2 und Z3 (P_4 -Töchter) zwischen die Darmzellen bei Kommastadien beobachtet worden (Sulston *et al.*, 1983).

Bei *A. nanus* wurden ähnliche Varianten in der räumlichen Anordnung von EMS, C und P_3 bzw. EMS, C, D und P_4 wie bei *D. coronatus* beschrieben (Skiba & Schierenberg, 1992; Kutzowitz, 1993; Schierenberg *et al.*, 1997/98). Auch bei dieser Spezies treten Wanderungen der P_4 und Kontaktaufnahme zu E auf (Skiba & Schierenberg, 1992).

Auf welche Weise findet P_4 ihr Ziel?

Um ihr Ziel zu finden, muss P_4 die Fähigkeit haben, andere Zellen und schließlich die E-Zelle zu identifizieren. Bei *C. elegans* konnte durch Zellisolation und Rekombination die Beteiligung eines Mechanismus der Zelloberflächenerkennung zwischen Keimbahn und Darmvorläuferzelle nachgewiesen werden (Goldstein, 1993). Die plausibelste Erklärung für die Wanderung der P_4 zur Darmvorläuferzelle ist, dass die E-Zelle ein Signal aussendet, welches die Keimbahnzelle über eine Distanz hinweg wahrnehmen kann.

Dieses Signal könnte in Form einer diffusionsfähigen Substanz oder eines Gradienten ausgesendet werden. Die Keimbahnzelle könnte dann entlang einer ansteigenden Konzentration über andere Blastomere hinweg wandern. Als weitere Möglichkeit könnten die Zellen zwischen P_4 und E als Relaisstationen dienen (Schnabel, 1995). Auch könnte mittels Filopodien oder Nanoröhrchen (Rustom *et al.*, 2004) der frühe Kontakt zwischen EMS und P_2 über Zellgenerationen hinweg zu E und P_4 aufrecht erhalten werden. Mit den beschränkten Möglichkeiten der Lichtmikroskopie sind solche Strukturen jedoch nicht nachweisbar.

9.4 Gastrulation

9.4.1 Gastrulation ohne Beteiligung eines Blastocoels

Die Gastrulation, in deren Verlauf Mesoderm und Endoderm gebildet werden, kann in eine Phase der Verlagerung von ein bis zwei Darmvorläuferzellen ins Zentrum zu einem recht frühen Zeitpunkt und eine Phase der Einwanderung von mesodermalen Vorläuferzellen in

einem höheren Zellstadium unterschieden werden. Die Zellbewegungen zeigen dabei Apekte der Immigration und Epibolie. Hier wird nur auf die Einwanderung der Darmvorläuferzellen eingegangen.

Die Gastrulation unter Beteiligung von 2 Darmvorläuferzellen ohne Bildung eines Blastocoels ist sehr verbreitet.

Das Muster der Gastrulation mit zwei Darmvorläuferzellen, die ins Zentrum immigrieren, ohne dass ein Blastocoel vorhanden ist, konnte bei allen von Blaxter *et al.*, 1998 aufgestellten Claden nachgewiesen werden. Von mit *C. elegans* nah verwandten Spezies wie *D. coronatus*, *N. dubius* und *N. brasiliensis* (alle Clade V) über zunehmend entferntere Vertreter wie *A. nanus* (Clade IV), *H. spumosa* (Clade III), *E. brevis* (Clade II) (Voronov & Panchin, 1998) bis zu verwandtschaftlich sehr entfernten Spezies wie *T. muris* sowie Vertretern der Mononchida und Dorylaimida (Malakhov, 1994; Gödde & Schierenberg, unveröffentlicht) (alle Clade I) kommen in jeder Clade Vertreter vor, die diesem Muster folgen.

Mitglieder der PCM-Gruppe gastrulieren unter Beteiligung nur einer Darmvorläuferzelle ohne Bildung eines Blastocoels.

Die in dieser Arbeit untersuchten Plectiden zeigen alle eine sehr frühe Einwanderung von nur einer Darmvorläuferzelle. Ein Blastocoel wird nicht gebildet, sondern die E-Zelle schiebt sich zwischen die anderen Zellen (Kapitel 7.7.2). Um zu prüfen, ob sich diese Besonderheit auf *Plectus*- und *Anaplectus*-Spezies beschränkt, wurden mit *T. auriculatus* und *E. arcticum* weitere Spezies anderer Genera der Plectiden untersucht. Auch sie zeigen eine frühe Einwanderung nur einer E-Zelle (Kapitel 7.7.3).

Das gleiche Muster der Gastrulation mit einer Darmvorläuferzelle wurde auch bei Chromadoriden und Monhysteriden gefunden (Malakhov, 1994; Schierenberg & Lahl, 2004; Einhard Schierenberg, unveröffentlicht). Sie werden deshalb (und aufgrund der gleichartigen Ausbildung der bilateralen Symmetrie) zusammen mit den Plectiden in dieser Arbeit zu der PCM-Gruppe zusammengefasst. Es handelt sich um Taxa, die von Blaxter *et al.* (1998) keiner Clade zugeordnet werden konnten und zwischen Clade II und Clade III positioniert sind (Abbildung 4.2).

Bei *C. elegans*, der unter normalen Bedingungen seine Gastrulation zu einem späten Zeitpunkt mit zwei Darmvorläuferzellen beginnt, konnte durch subletale Schädigung der E-Zelle eine Teilung in zwei Darmvorläuferzellen zeitlich verschoben werden. Die Gastrulation erfolgte dann unabhängig von der Zellzahl mit einer Darmvorläuferzelle wie bei der PCM-Gruppe, jedoch zu einem für *C. elegans* üblichen späten Zeitpunkt. Die weitere Entwicklung war normal.

Unter natürlichen Umständen kann die Gastrulation bei *C. elegans*, bei dem die MS- und E-Linie noch durch einen midbody verbunden sind (Krieg *et al.*, 1978), wahrscheinlich aufgrund seiner schnellen Entwicklung nicht so früh wie bei Plectiden stattfinden (Lahl *et al.*, 2003).

Die Grenze zwischen Rhabditida und der PCM-Gruppe kann anhand der Gastrulation scharf gezogen werden.

Um die Grenze zwischen den als Rhabditida bezeichneten Claden III, IV und V und der PCM-Gruppe zu bestimmen, wurde der nächste Nachbar der im phylogenetischen Stammbaum (Blaxter *et al.*, 1998) aufgelisteten *Plectus*-Spezies, *T. lirellus*, untersucht. Nach Blaxter *et al.* handelt es sich hier ebenfalls um einen Plectiden.

Bei *T. lirellus* konnte zwar die für Plectiden typische Verzögerung der Teilung der E-Linie beobachtet werden (Tabelle 4). Trotz seiner verwandtschaftlichen Nähe zu den Plectiden gastruliert *T. lirellus* jedoch erst nach dem 24-Zellstadium mit 2 E-Zellen und ähnelt in dieser Hinsicht *C. elegans* weit mehr als den Mitgliedern der PCM-Gruppe (Kapitel 7.7.3). Auch andere in dieser Arbeit untersuchte Aspekte der räumlichen Anordnung (bilaterale Symmetrie) weisen *T. lirellus* klar als Vertreter der Rhabditida aus.

In dem von De Ley & Blaxter (2002) erstellten phylogenetischen Stammbaum, der auf molekularen und morphologischen Daten basiert, sind die Teratocephalidae neu positioniert worden und nehmen dort gemäß den hier gemachten Untersuchungen eine Position innerhalb der Rhabditida ein. Die Grenze zwischen den Rhabditida und der PCM-Gruppe verläuft also anscheinend zwischen den Plectidae und den Teratocephalidae.

Es gibt Bestrebungen, die Ordnungen Chromadorida, Desmodorida und Monhysterida (Malakhov, 1994) zusammen mit den Plectiden in einem Taxon Chromadoria (Pearse, 1942; Drozdovskii, 1981; Malakhov, 1994; beachte, dass De Ley & Blaxter, 2002, denselben Namen Chromadoria unter Einschluss der Rhabditida benutzen) bzw. Torquentia (Andrássy, 1984) zu kombinieren. Dies bedingt die Neupositionierung von *Teratocephalus* als Vertreter der Rhabditida (Andrássy, 1984; De Ley & Blaxter, 2002) passend zu den hier vorgestellten Ergebnissen.

Der Gastrulationstyp kann als phylogenetisches Merkmal herangezogen werden.

Die Tatsache, dass bei jeder Spezies entweder nur eine oder zwei Darmvorläuferzellen ins Zentrum verlagert werden und bis jetzt natürlicherweise keine Zwischenformen beobachtet werden konnten, es also nur zwei Merkmalsausprägungen gibt, macht diesen Prozess zu einem gut definierbaren, phylogenetischen Marker.

Da auch ansonsten sehr ursprüngliche Vertreter der zu Clade I gehörenden Mononchida, Dorylaimida (Malakhov, 1994; Gödde & Schierenberg, unveröffentlicht) und *E. brevis* (Voronov & Panchin, 1998) eine Gastrulation mit zwei E-Zellen zeigen, scheint eine solche Gastrulation plesiomorph gegenüber der Gastrulation mit einer E-Zelle zu sein. Die

Verlagerung nur einer Darmvorläuferzelle ins Zentrum innerhalb der PCM-Gruppe ist demzufolge eine Synapomorphie.

Die Darmvorläuferzelle kann von der anterioren oder der posterioren Blastomere des 2-Zellstadiums abstammen.

Bei fast allen in dieser Arbeit untersuchten Nematodenspezies stammt die Darmvorläuferzelle von der posterioren Blastomere des 2-Zellstadium ab. Bei Mitgliedern der Claden I und II wie dem in dieser Arbeit untersuchten *T. muris*, *T. diversipapillatus* (Schierenberg, 2005) sowie einigen von Malakhov 1994 beschriebenen Spezies geht jedoch die Darmvorläuferzelle bzw. das Endoderm aus der anterioren Blastomere hervor bzw. stammt vom anterioren Pol. Die Herkunft von E oder eines ihr entsprechenden Gewebes ist unabhängig davon, ob die Gastrulation mit einer oder zwei E-Zellen bzw. unter Beteiligung eines Blastocoels stattfindet. Es gibt keine Korrelation zwischen der Herkunft des Endoderms und dem Gastrulationstypus.

9.4.2 Gastrulation mit Beteiligung eines Blastocoels

Eine vollkommen andere Art der Gastrulation zeigte sich bei der Untersuchung von *T. spiralis* (Clade I). Diese Spezies gastruliert unter Blastocoelbildung. Dabei wird ein zentraler Hohlraum von einer einlagigen Zellschicht gebildet, in den sich eine Zellmasse einschiebt (Kapitel 8.5.2, Abbildung 8.22). Die Hauptart der Zellbewegung ist hier die Invagination statt der bisher beobachteten Immigration bei anderen Nematoden.

Ähnliche Beobachtungen machte Schierenberg 2005 an dem Triplonchiden *T. diversipapillatus* (Schwestertaxon der Enoplida, Clade II). Auch diese Spezies bildet einen großen, zentralen Hohlraum, in den sich vom späteren anterioren Pol Zellen einschieben. Der zentrale Hohlraum wird zunehmend verkleinert und es kann später ein Endo- und ein Mesoderm unterschieden werden. Hinsichtlich anderer Kriterien scheint sich *T. diversipapillatus* jedoch wie andere Enoplia zu verhalten.

Blastocoelbildung bei Nematoden ist plesiomorph.

Die Gastrulation unter Blastocoelbildung ist bei Nematoden sehr selten und konnte bis jetzt nur bei *T. diversipapillatus* und *T. spiralis* beobachtet werden. Es scheint wahrscheinlich, dass diese Form der Gastrulation insgesamt plesiomorph ist und die Gastrulation ohne Blastocoelbildung wie bei *C. elegans* und allen übrigen bisher untersuchten Nematoden apomorph ist.

Ein Argument dafür ist, dass die Gastrulation unter Blastocoelbildung im gesamten Tierreich weit verbreitet ist (Malakhov, 1994; Arendt, 2004). Das bedeutet, dass *T. diversipapillatus* und *T. spiralis* phylogenetisch an der Basis der Nematoda positioniert sind, selbst innerhalb der Enoplea. Morphologische und molekulare Analysen legen nahe, dass Clade II (*Tobrilus diversipapillatus*) den ältesten Ast der Nematoden repräsentieren könnte (Malakhov, 1994;

Aleshin *et al.*, 1998). Anscheinend ist der ursprüngliche Gastrulationstyp mit *T. spiralis* auch bei zumindest einer Spezies von Clade I erhalten geblieben.

Die bisherigen Stammbäume lösen die Basis der Nematoden allerdings nicht klar auf, so dass es weiterer Untersuchungen bedarf, die vielleicht eine Neupositionierung von *T. spiralis* innerhalb der Enoplia wie schon zuvor und damit in Clade II mit sich bringen. (Enoplea= Enoplia + Dorylaimia; Enoplia= Enoplida + Triplonchida; Vergleiche dazu auch De Ley, 2006).

Insgesamt können die von Schierenberg 2005 gemachten Aussagen über die Gastrulation auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Nematoden bestätigt werden: Der Typ der Gastrulation korreliert nicht mit der Größe des Embryos oder der Zellzahl. Es besteht kein Zusammenhang zwischen dem Gastrulationstypen und dem Zellteilungsmuster. Entwicklungsgeschwindigkeit und Gastrulationstyp bedingen sich nicht. Der Gastrulationstyp hängt nicht von dem Dottergehalt ab.

9.5 Etablierung der bilateralen Symmetrie

Die bilaterale Symmetrie innerhalb einzelner Zelllinien wird bei den meisten Nematoden schrittweise etabliert.

Bei *C. elegans*, *D. coronatus* und *A. nanus* entstehen entweder mit der ersten (MS, C, D) oder mit der zweiten (E, AB) Teilung Tochterzellen, die jeweils die spätere rechte bzw. linke Seite begründen. Durch eine zunächst vorherrschende anterior-posteriore Spindelausrichtung bzw. in der AB-Zelllinie durch Verschiebung rechter und linker Anteile gegeneinander wird die frühe bilaterale Aufspaltung der Zelllinien nicht sofort deutlich. Durch weitere Zellteilungen und Verschiebungen nähern sich die Zellen zunehmend ihrer endgültigen rechten und linken Position im Embryo an (Kapitel 7.8.1, 7.8.2).

Bei der D- und der C-Linie von *D. coronatus* ist die bilaterale Symmetrie schneller erreicht als bei *C. elegans*. Auch insgesamt scheint die Etablierung der rechts-links Symmetrie bei *D. coronatus* etwas schneller abgeschlossen zu sein als bei *C. elegans* (Lahl *et al.*, 2003).

Auch bei *A. nanus* erfolgt die Ausbildung der bilateralen Symmetrie auf fast gleiche Weise. Die C-Zelle teilt sich zwar direkt in die rechte und linke Tochterzelle Cr und Cl, aber MS verhält sich wie bei *C. elegans* und *D. coronatus* und teilt sich zunächst mit anterior-posteriorer Ausrichtung. *A. nanus* scheint damit eine Zwischenstellung zwischen sofortiger Etablierung und schrittweiser Etablierung einzunehmen.

Alles in allem treten bei diesen drei Spezies nur geringe Unterschiede hinsichtlich der Art und Weise der Etablierung auf. Die Ausbildung der bilateralen Symmetrie ist ein graduell variierendes Merkmal.

Auch die frühe Anordnung der Blastomeren von *H. spumosa*, *N. dubius* und *N. brasiliensis* lässt eine nach und nach stattfindende Etablierung der bilateralen Symmetrie innerhalb der einzelnen Zelllinien vermuten.

Die bilaterale Symmetrie wird bei Plectiden mit der Geburt der Zellen etabliert.

Die Etablierung der bilateralen Symmetrie bei Plectiden unterscheidet sich deutlich von der der oben beschriebenen Spezies.

Statt einer anterior-posterioren oder zumindest schrägen Teilungsrichtung vollziehen hier alle Zelllinien schon die erste Teilung in strikter rechts-links Richtung, so dass die frühe bilaterale Aufspaltung der Zelllinien sofort deutlich wird. Bilateral symmetrische Strukturen entstehen hier von Geburt der Zellen an. Es sind keine weiteren Zellteilungen oder -verschiebungen nötig, um eine Symmetrie zu etablieren (Lahl *et al.*, 2003) (Kapitel 7.8.3).

Anders als bei *C. elegans*, *A. nanus* und *D. coronatus* liegen die linken AB-Zellen zu keinem Zeitpunkt weiter anterior als die rechten AB-Zellen. Die aufgrund dieser Beobachtung naheliegende Annahme, dass sich bei Plectiden die bilaterale Symmetrie im anterioren Bereich der AB-Zelllinie so ausprägt wie in den anderen somatischen Linien, konnte jedoch durch die in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Die Symmetriebildung innerhalb der AB-Zelllinie zumindest von „P. mekong“ ist sehr komplex. Für den zugänglichen anterior-ventralen Bereich konnte festgestellt werden, dass trotz vorausgehender rechts-links Teilungen rechte und linke Anteile erst mit der Teilung von AB_{llvv} im 32-AB-Zellstadium getrennt werden. Wie bei *C. elegans* sind auch bei „P. mekong“ zumindest im anterior-ventralen Bereich letztendlich Nachkommen der linken AB-Zellen zueinander bzw. in sich selbst symmetrisch.

Die frühe und unmittelbare Art der Etablierung der bilateralen Symmetrie ist allen untersuchten Vertretern der *Plectus*- und *Anaplectus*-Spezies sowie *E. arcticum* und *T. auriculatus* gemein. Auch die Vertreter der schon vorher definierten PCM-Gruppe zeigen diese Art der frühen rechts-links Symmetrie (Malakhov, 1994).

Bei *T. lirellus*, einem nahen Verwandten der Plectiden (Blaxter *et al.*, 1998), teilen sich die Blastomeren wie bei *C. elegans*, *A. nanus* und *D. coronatus* zunächst in anterior-posteriore Richtung und die bilaterale Symmetrie wird erst schrittweise erreicht.

Auch Spezies außerhalb der PCM-Gruppe zeigen eine unmittelbare Etablierung der bilateralen Symmetrie.

Kennzeichen der Plectiden und der PCM-Gruppe ist die frühe Gastrulation mit einer E-Zelle und die frühe Etablierung der bilateralen Symmetrie.

Anders als der Gastrulationstyp ist die unmittelbare Etablierung der bilateralen Symmetrie jedoch nicht auf diese Gruppe der Nematoden beschränkt. Untersuchungen an *Ascaris* sp., Mitglied von Clade III, ergaben eine ähnliche frühe bilaterale Symmetriebildung (zur Strassen, 1896; Boveri, 1899). Verwandtschaftlich sind Ascariden jedoch nicht sehr weit von der PCM-Gruppe entfernt (Abbildung 4.2).

9.6 Regulation

Die Regulationsfähigkeit der verschiedenen Spezies ist sehr unterschiedlich. D. coronatus und „P. mekong“ können ablatierte Zellen nicht ersetzen.

Um das regulative Potential von *D. coronatus* (Clade V) und „P. mekong“ (PCM-Gruppe) zu prüfen, wurde bei beiden Spezies jeweils die EMS-Zelle direkt nach ihrer Entstehung ablatiert und die verbleibenden Zellen, insbesondere die C-Zelle, wurden auf Anzeichen für eine Zellschicksalstransformation untersucht (Kapitel 7.9.1).

Bei „P. mekong“ zeigten sich in keinem Fall Anzeichen für eine Transformation der C-Zelle zum EMS-Schicksal. „P. mekong“ ist nicht in der Lage, ablatierte Zellen zu ersetzen.

Auch bei *D. coronatus* fand keine Transformation des C-Zellschicksals statt. In zwei Fällen konnte eine abweichende anterior-posteriore Teilungsrichtung von C beobachtet werden. Durch weitere Teilungen wurde diese Anordnung aber wieder korrigiert. Es fanden auch bei *D. coronatus* keine Aufspaltung in zwei somatische Zelllinien, keine Immigration und keine Darmzelldifferenzierung statt.

Hinsichtlich der Regulationsfähigkeit verhalten sich „P. mekong“ und *D. coronatus* wie *C. elegans*.

Die Regulationsfähigkeit bei Nematoden variiert beträchtlich zwischen den einzelnen Spezies. Enoplida (Clade II) werden als hochregulativ beschrieben. Nach experimenteller Zerstörung innerer Gewebe sind sie in der Lage, diese zu regenerieren. Diese Fähigkeit unterstützt die Annahme, dass Enopliden ursprünglicher sind als andere Nematoden (Malakhov, 1998). Wiegner & Schierenberg (1998, 1999) untersuchten die Zellspezifizierung und die Regulationsfähigkeit von *A. nanus* (Clade IV) und erkannten, dass die frühen Blastomeren um Zellschicksale konkurrieren. Bei Ablation einzelner somatischer Gründerzellen werden die verloren gegangenen Schicksale in hierarchischer Weise von anderen Zellen ersetzt. Die frühen Blastomeren von *A. nanus* sind multipotent. Durch laterale Inhibition wird sichergestellt, dass jedes Schicksal verwirklicht wird.

Die Regulationsfähigkeit ist wahrscheinlich plesiomorph und in verschiedenen Spezies unabhängig voneinander verloren gegangen.

Da die Fähigkeit zur Regulation bei den nah verwandten *C. elegans* und *D. coronatus* fehlt, bei dem etwas weiter entfernten *A. nanus* auftritt und bei dem noch weiter entfernten „P. mekong“ wieder fehlt, ist sie nicht Merkmal einer bestimmten, verwandtschaftlich nah stehenden Gruppe. Im Zusammenhang mit der Regulationsfähigkeit von Enopliden, die in mehreren anderen Belangen als sehr ursprünglich angesehen werden, scheint es wahrscheinlich, dass die Regulationsfähigkeit ein ursprüngliches Merkmal ist, das bei *A. nanus* erhalten geblieben, bei den meisten anderen Nematodenspezies jedoch verloren gegangen ist. Denkbar, aber unwahrscheinlicher wäre auch ein Neuerwerb dieser Fähigkeit

bei *A. nanus* und den Enopliden. Man würde in einem solchen Fall jedoch erwarten, dass sich die Regulationsfähigkeit nicht auf eine so kleine Gruppe beschränkt.

9.7 Phylogenie

Embryologische Daten ergänzen die aus molekularen Daten gewonnenen Informationen.

Frühere phylogenetische Stammbäume basierten allein auf vergleichenden, morphologischen Untersuchungen. Eine besondere Schwierigkeit ist hierbei, zwischen Homologie und Konvergenz zu unterscheiden.

Durch die in den letzten Jahren gewonnenen molekularbiologischen Daten konnten Verwandtschaftsverhältnisse wesentlich genauer aufgeschlüsselt werden. Nicht zutreffende Klassifizierungen konnten revidiert werden, andere Zusammenhänge wurden verifiziert. Die neue Art der Datengewinnung liefert eine Vielzahl von Informationen, die die Aufstellung von sehr detaillierten phylogenetischen Stammbäumen ermöglicht (Blaxter *et al.*, 1998; De Ley & Blaxter, 2002). Trotz der scheinbaren Eindeutigkeit der so gewonnenen Daten bleibt es jedoch Interpretationssache, welche der mehreren möglichen Verbindungen die wahrscheinlichste ist. Aus diesem Grunde ist jede unabhängige, zusätzliche Information hilfreich, um die richtigen Schlussfolgerungen zu ziehen und die Komplexität der Phylogenie der Nematoden besser zu verstehen (Raff, 2000).

Entwicklungsbiologische Prozesse sind neben morphologischen und molekularbiologischen Daten hilfreich, um Beziehungen zwischen verschiedenen Nematodenspezies aufzudecken und so als phylogenetische Marker zu dienen. Solche Prozesse sind unabhängig, weil Unterschiede auf molekularer Ebene entwicklungsbiologische Vorgänge mitunter nicht beeinflussen und Variationen in der Entwicklung sich nicht unbedingt in finalen Strukturen niederschlagen (z. B. Gastrulation, Art und Weise der Etablierung der bilateralen Symmetrie) (Raff, 1996; Houthoofd *et al.*, 2006). Zusätzlich stellen entwicklungsbiologische Prozesse eher Vorgänge als Strukturen dar, so dass ihre Erforschung den zeitlichen Aspekt mit berücksichtigt (Schierenberg, 2001; Schierenberg & Lahl, 2004).

Modifikationen des phylogenetischen Stammbaums von Blaxter et al. (1998) aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen entwicklungsbiologischen Daten

Blaxter *et al.* (1998) sammelten molekularbiologische Daten von mehr als 50 Nematodenspezies. Ihr phylogenetischer Stammbaum weist eine Reihe von Unterschieden gegenüber auf morphologischen Daten basierenden Stammbäumen auf. Dies beinhaltet die Aufspaltung in fünf verschiedene Claden statt in die vormals verwendeten beiden Klassen Adenophorea und Secernentea. Für mehrere vorher zusammengefasste Gruppen konnte der polyphyletische Charakter nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4).

Aufgrund der in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen und einiger anderer Arbeiten (Malakhov, 1994; Voronov & Panchin, 1998; Aleshin *et al.*, 1998) schlagen wir vor, den phylogenetischen Stammbaum von Blaxter *et al.* (1998) wie folgt zu modifizieren.

Statt der fünf postulierten Claden schlagen wir eine Einteilung in 6 Claden vor. Dabei werden die Mitglieder der von uns eingeführten PCM-Gruppe (Plectida, Chromadorida und Monhysterida) in einer eigenen Clade 3 zusammengefasst. Die bisher untersuchten Vertreter dieses Taxons zeigen alle eine frühe Gastrulation mit einer Darmvorläuferzelle sowie eine frühe und unmittelbare Etablierung der bilateralen Symmetrie. Anders als der Symmetriotyp ist der Gastrulationstyp auf die PCM-Gruppe beschränkt, er wird als Synapomorphie betrachtet. Dies impliziert jedoch einen monophyletischen Ursprung der Clade 3, was durch molekulare Daten bisher allerdings nicht unterstützt wird. Diese Daten, die auf 18S rDNA-Sequenzen beruhen, spiegeln jedoch nur einen Teil der möglichen Variationen wider.

Die neue Clade 3 ist scharf gegenüber anderen Taxa abgegrenzt. Teratocephalidae als Rhabditida und Nachbargruppe der neuen Clade 3 markieren dabei die Grenze. Sie zeigen anders als Vertreter der Clade 3 eine Gastrulation mit zwei Darmvorläuferzellen und eine schrittweise Etablierung der bilateralen Symmetrie. Dementsprechend werden Teratocephalidae, die noch 1998 als Plectiden betrachtet wurden, in einem neuen molekularen Stammbaum von De Ley & Blaxter 2002 zu den Rhabditida gehörend eingeteilt.

Plectidae wurden traditionell als Mitglieder der Adenophorea eingeteilt. Inzwischen werden sie jedoch neben Spezies, die zu den Secernentea gehören, eingeordnet (De Ley & Blaxter, 2002), "*suggesting that it may be a surviving representative of the group from within which the Secernentean radiation began*" (Blaxter *et al.*, 1998). Die in dieser Arbeit untersuchten Plectiden zeigen in ihrer Embryonalentwicklung eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten mit den früher als Secernentea bezeichneten Nematoden, nicht aber mit den Adenophorea. Die Positionierung in der Nähe der Secernentea kann also aus embryologischer Sicht unterstützt werden. Trotzdem zeigen Plectidae aber auch einige Unterschiede gegenüber den Secernentea wie die frühe Ausbildung der bilateralen Symmetrie und die frühe Gastrulation mit einer Darmvorläuferzelle, die vermuten lassen, dass eine frühe Abspaltung der Plectidae von den Secernentea stattgefunden hat (Lahl *et al.*, 2003).

Zusätzlich zur Einführung der neuen Clade 3 schlagen wir eine Umbenennung der alten Clade I in Clade 2 und umgekehrt vor (römische Ziffern: alte Bezeichnung von Blaxter *et al.*, arabische Ziffern: neue Bezeichnung). Die Enopliden (alte Clade II) scheinen aufgrund ihrer hohen Variabilität, der späten Festlegung der Zellschicksale, des Fehlens einer frühen Keimbahn und der ausgeprägten Regulationsfähigkeit ursprünglicher zu sein als die Vertreter der bisherigen Clade I. Nach molekularen Daten stehen beide Claden gleichwertig nebeneinander. Was I und II benannt wird, ist beliebig. Mit unserem Vorschlag soll eine deutlichere Korrelation zwischen Ontogenese und Phylogenese hergestellt werden (Schierenberg & Lahl, 2004). Anatomische und molekulare Untersuchungen anderer Autoren unterstützen die Vorstellung, dass Enoplia den ältesten Zweig der Nematoden darstellen (Malakhov, 1994; Aleshin *et al.*, 1998; Holterman *et al.*, 2006).

In Kombination der in dieser Arbeit gewonnenen embryologischen Daten mit Malakhov, (1994) Blaxter *et al.* (1998) und De Ley & Blaxter (2002) können entsprechend vier verschiedene Taxa definiert werden, die Enoplia (neue Clade 1), Dorylaimia (neue Clade 2), Chromadoria (neue Clade 3) und Rhabditia (neue Claden 4-6) benannt werden können. Abbildung 9.3 modifiziert den Stammbaum von Blaxter *et al.* (1998) und fasst die von uns vorgeschlagenen Änderungen zusammen (Schierenberg & Lahl, 2004; Schierenberg, 2006).

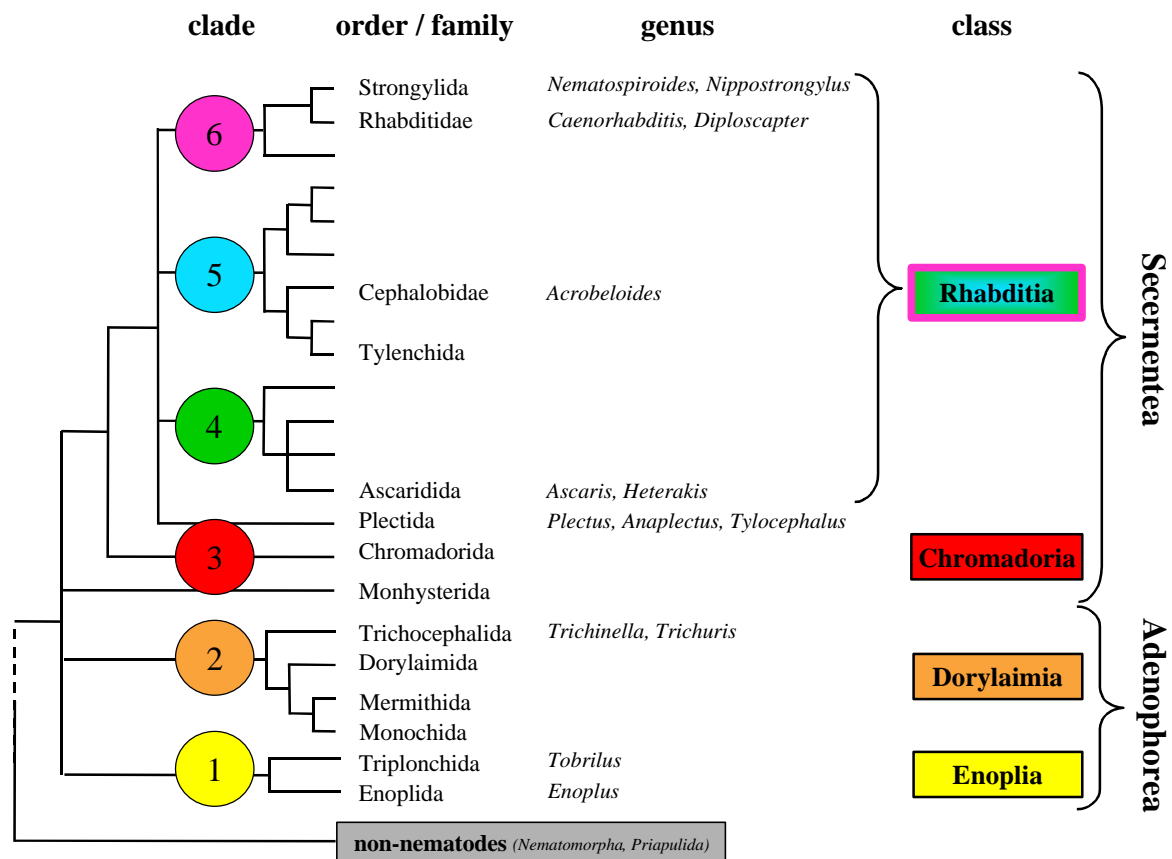


Abbildung 9.3: Aufgrund embryologischer Untersuchungen modifizierter phylogenetischer Stammbaum von Blaxter *et al.*, 1998. Die PCM-Gruppe erhält den Status einer Clade, so dass sechs statt fünf Claden definiert werden. Die alten Claden I und II sind vertauscht, so dass die neue Clade 1 (alte Clade II) jetzt die Basis bildet.

Blaxter *et al.* (1998) rechnen *T. spiralis* und *T. muris* als Trichocephalida zu Clade I und damit zu einer anderen Clade als die Enoplida (Abbildung 4.2). Gerade die Embryologie von *T. spiralis* zeigt jedoch hinsichtlich der Blastocoelbildung starke Gemeinsamkeiten mit dem zu den Enoplia gehörenden *T. diversipapillatus* (Triplonchida: Nachbaraxon der Enoplida). Ob diese Besonderheit unabhängig voneinander bei diesen beiden Spezies erhalten geblieben ist und/oder ob sie eine engere Verwandtschaft kennzeichnet, die eine Neupositionierung von *T. spiralis* in größere Nähe zu *T. diversipapillatus* rechtfertigt, bedarf weiterer Untersuchungen. Im phylogenetischen Stammbaum von De Ley & Blaxter (2002) sind die Trichocephalida zumindest zusammen mit den Enoplida und den Triplonchida in einer Clade positioniert.

10 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die bislang nur geringen Kenntnisse der Embryogenese von Nematoden zu erweitern, Gemeinsamkeiten und Unterschiede sowie die Kontrolle von embryologischen Prozessen bei verschiedenen Spezies aufzuklären und ihre Eignung als phylogenetische Marker zu überprüfen.

Es wurden verschiedene Aspekte der Embryonalentwicklung von verwandtschaftlich unterschiedlich weit von *Caenorhabditis elegans* entfernten Nematodenspezies in Abhängigkeit von ihrer phylogenetischen Positionierung untersucht. Dabei wurden sowohl freilebenden Spezies, darunter Cephalobiden, Diploscapteriden, Plectiden und der mit ihnen nah verwandte *Teratocephalus lirellus*, als auch parasitäre Spezies *Nematospiroides dubius*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Heterakis spumosa*, *Trichinella spiralis* und *Trichuris muris* verwendet. Basis für die phylogenetische Positionierung bildeten die auf molekularen Daten beruhenden Arbeiten von Blaxter *et al.* (1998) und De Ley & Blaxter (2002).

Mittels Differential-Interferenz-Kontrastmikroskopie, DNA-Anfärbung, Narkotisierung, indirekter Immunfluoreszenz, Zellablation und Zellelimination wurde die frühe Embryogenese der verschiedenen Spezies untersucht. Schwerpunkte bildeten dabei die Morphologie, die Fortpflanzungsweise, die Reduktionsteilung, die Eiaktivierung, die Etablierung der Gründerzellen, das Verhalten der frühen Keimbahn, die Ausbildung und Kontrolle der Raumachsen, die frühe räumliche Musterbildung, die Herkunft der E-Zelle und die Einwanderung des Darmvorläufers, die Darmzelldifferenzierung, die Etablierung der bilateralen Symmetrie und die Regulationsfähigkeit. Es wurden dreidimensionale Computerrekonstruktionen früher Embryonen von *C. elegans*, *Diploscapter coronatus*, *Acrobeloides nanus* und „Plectus mekong“ unter Aufschlüsselung der einzelnen Zelllinien angefertigt.

Anhand voneinander abweichender Eiaktivierung, Reduktionsteilung und Etablierung der anterior-posterior Achse konnte für die beiden parthenogenetischen Spezies *D. coronatus* und „P. mekong“ eine verschiedene Anpassung an ihre Fortpflanzungsweise nachgewiesen werden.

Bei *D. coronatus* wurden individuelle Variationen der frühen räumlichen Musterbildung und ihre Entstehungsweise beobachtet und aufgeklärt. Experimentell konnte die Kontrolle der Etablierung der anterior-posterior Achse und der dorso-ventralen Achse nachgewiesen werden.

Aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen embryologischen Gemeinsamkeiten (z. B. die frühe Keimbahn-Soma-Trennung) der Plectiden mit den Secernentea, nicht aber mit den Adenophorea, konnte die von Blaxter *et al.* (1998) vorgeschlagene Neupositionierung der traditionell als Adenophorea betrachteten Plectiden in die Nähe von secernentischen Spezies unterstützt werden.

Durch die Untersuchungen an Plectiden und den Vergleich mit Spezies der Secernentea sowie Adenophora konnten embryologische Besonderheiten der Plectiden wie die frühe Etablierung der bilateralen Symmetrie und die Gastrulation mit nur einer Darmvorläuferzelle herausgefunden werden, die die frühe Trennung der Plectiden von anderen Secernentea nahelegen.

Wegen der Gleichartigkeit dieser embryologischen Besonderheiten bei Plectiden, Chromadorida und Monhysterida erfolgte ihre Zusammenfassung in der PCM-Gruppe. Diese Ergebnisse widersprechen der traditionellen Sichtweise der phylogenetischen Positionierung von Plectiden, sind aber in Einklang mit den Schlussfolgerungen, die aus molekularen Daten gezogen werden.

Durch die vergleichende Untersuchung von *T. lirellus* und *Tylocephalus auriculatus* mit anderen Plectiden konnte *T. lirellus* als Rhabditide identifiziert und so die Abgrenzung der Plectiden gegenüber den Rhabditida vorgenommen werden.

Die Untersuchung von *N. dubius*, *N. brasiliensis*, *H. spumosa*, *T. spiralis* und *T. muris* zeigte, dass die frühe Embryogenese von parasitären Spezies denselben Prinzipien wie die der nah mit ihnen verwandten freilebenden Spezies folgt.

Bei *T. spiralis* und *T. muris* als verwandtschaftlich sehr weit von *C. elegans* entfernte Spezies konnten dementsprechend gravierende Unterschiede in der Etablierung der somatischen Gründerzellen und der frühen räumlichen Musterbildung zu *C. elegans* nachgewiesen werden. Bei *T. spiralis* konnte die unter Nematoden bis jetzt nur einmal in dieser Form nachgewiesene Bildung eines großen Blastocoels gezeigt werden.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wurden Modifikationen des von Blaxter *et al.* (1998) erarbeiteten, phylogenetischen Stammbaums vorgeschlagen und begründet. Diese Änderungen beinhalten die Zusammenfassung von Plectiden mit Chromadorida und Monhysterida in einer neuen Clade 3 und den Tausch der alten Clade I mit Clade II. Die Gesamtzahl erhöht sich dadurch von fünf auf sechs Claden.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass embryologische Vorgänge zur Bestimmung phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen geeignet sind und mit ihrer Hilfe Widersprüche hinsichtlich der Positionierung von Nematodenspezies aufgeklärt werden können. Ihre Erforschung als ergänzende Methode zur Morphologie und Molekularbiologie liefert Daten einer Qualität, die mit anderen Mitteln nicht erfassbare Details ans Licht bringen.

11 Summary

The aim of this work has been to broaden the presently only limited knowledge of embryogenesis in nematodes. The presented data demonstrate both, similarities and differences, in nematode development among different species as well as in the control of embryological processes. Special emphasis was placed on solving contradictions regarding the positioning in different phylogenetic trees, and examining the suitability of embryonic events as phylogenetic markers.

Several nematode species closely or more distantly related to *Caenorhabditis elegans* have been examined concerning different aspects of embryonic development. For the phylogenetic positioning of the investigated nematode species, the works of Blaxter *et al.* (1998) and De Ley & Blaxter (2002) were taken as a basis and extended in the course of this work. The investigated species comprise on the one hand free-living species like Cephalobidae, Diploscapteridae, Plectids, and the closely related *Teratocephalus lirellus* and on the other hand parasitic species like *Nematospiroides dubius*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Heterakis spumosa*, *Trichinella spiralis*, and *Trichuris muris*.

By means of differential interference contrast microscopy, DNA staining, anaesthetising, indirect immunfluorescence, cell ablation and cell elimination early embryogenesis of the different nematode species was examined. The emphasis of the investigation was placed on

- the morphology
- the way of reproduction
- the meiosis
- the egg activation
- the establishment of founder cells
- the behaviour of the early germline cell
- the establishment of the embryonic axes and its control
- the early spatial arrangement of blastomeres
- the origin of the gut precursor cell(s) and its immigration
- the differentiation of gut
- the establishment of bilateral symmetry
- and the ability to compensate for lost cells.

Three dimensional computer reconstructions of early *C. elegans*, *Diploscapter coronatus*, *Acrobelloides nanus* and „Plectus mekong“ embryos were developed considering single cell lineages.

Visualizing differences in egg activation and meiosis in the parthenogenetic species *D. coronatus* and „*P. mekong*“ a different adaptation to their way of reproduction could be demonstrated.

Within the *D. coronatus* species individual variations in early pattern formation were observed and how these eventually merge into one pattern. Experimentally, the control of the establishment of the anterior-posterior and the dorsal-ventral axis was analyzed.

Based on embryological aspects studied in this work which Plectids share with Secernentea but not with Adenophorea (e.g. early germline-soma-separation), the phylogenetical repositioning of Plectids traditionally considered as adenophorean species, to a close neighborhood to secernentean species could be supported as suggested by Blaxter *et al.* (1998).

As a result of the studies on Plectids and the comparison with species of Secernentea and Adenophorea, embryological characteristics of Plectids could be identified like early establishment of bilateral symmetry and gastrulation with only one gut precursor cell. This suggests that Plectids separated early from other secernentean species. Because of the restriction of these embryological characteristics to Plectids, Chromadorida and Monhysterida these species are unified in the PCM-group.

These results are in conflict to the traditional phylogenetic positioning of Plectids but are in agreement with the conclusions drawn from molecular data.

Furthermore, *Tylocephalus auriculatus* was identified as a Rhabditid by comparing gastrulation with *T. lirellus* and other Plectids. Thus, we detected this way the demarcation line between Plectida and Rhabditida.

The analysis of *N. dubius*, *N. brasiliensis*, *H. spumosa*, *T. spiralis*, and *T. muris* showed that early embryogenesis of parasitic species follows the same principles as closely related free-living species. In *T. spiralis* and *T. muris* - which are very distantly related to *C. elegans* - fundamental differences in the establishment of somatic founder cells and the early pattern formation could be found. In *T. spiralis* the formation of a large blastocoel could be shown which was demonstrated only in one additional case among nematode species so far.

Based on the results of this work, modifications of the phylogenetic tree of Blaxter *et al.*, 1998 were suggested. These changes include the unification of Plectids with Chromadorida and Monhysterida in a newly defined clade 3 and the switch of the old clades I and II. The total number of clades increases thereby from five to six.

The results of this work demonstrate that the study of embryological processes is a valuable tool for the identification of phylogenetic relationships among nematodes and that this approach provides detailed insights into aspects which are not available via morphology and molecular biology.

12 Literaturverzeichnis

- Adamson, M. (1987): Phylogenetic analysis of the higher classification of the Nematoda. *Can J Zool* 65, 1478-1482
- Alberts, B., Bray, D., Levis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1990): *Molekularbiologie der Zelle*. VHC-Verlagsges. mBH, Weinheim, BRD
- Albertson, D. G. & Thomson, J. N. (1993): Segregation of holocentric chromosomes at meiosis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chromosome Res* 1, 15-26
- Albertson, D. G. (1984): Formation of the first cleavage spindle in nematode embryos. *Dev Biol* 101, 61-72
- Aleshin, V. V., Kedrova, O. S., Milyutina, I. A., Vladychenskaya, N. S., Petrov, N. B. (1998): Relationships among nematodes based on the analysis of 18S rRNA gene sequences: molecular evidence for monophyly of Chromadorian and Secernentean nematodes. *Russ. J. Nematol.* 6, 175–184
- Anderson, R. V. (1969): Comparative morphology and descriptions of three new species of *Teratocephalus* from Canada. *Canadian Journal of Zoology* 47, 829-840
- Anderson, R. C., Chabaud, A. G., Willmott, S. (1974-1983): *CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates*. CAB International, Wallingford, Conn
- Anderson, R. C. (1992): *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission*. CAB International, Wallingford, UK
- Andrássy, I. (1958): Erd- und Süßwassernematoden aus Bulgarien. *Acta zool hung*, 4, 1-88
- Andrássy, I. (1984): *Klasse Nematoda*. Fischer, Stuttgart
- Arendt, D. (2004): Comparative aspects of gastrulation. In: *Gastrulation from cells to embryo*, C.D. Stern, ed. (New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 679–693
- Belar, K. (1923): Über den Chromosomenzyklus von parthenogenetischen Erdnematoden. *Biol Zbl* 43, 513-518
- Bernt, U., Junkersdorf, B., Londershausen, M., Harder, A., Schierenberg, E. (1998): Effects of anthelmintics with different modes of action on the behaviour and development of *Caenorhabditis elegans*. *Fundam appl Nematol* 21, 251-263
- Bird, A. F.; De Ley, P.; Bird, J. (1994): Morphology, oviposition and embryogenesis in an Australian population of *Acroboloides nanus*. *Journal of Nematology* 25, 607-615
- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheideman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., Thomas, W. K. (1998): A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71-75

- Blaxter, M. L., Dorris, M., De Ley, P. (2000): Patterns and processes in the evolution of animal parasitic nematodes. *Nematology* 2, 43-55
- Bolker, J. A. (1995): Model systems in developmental biology. *BioEssays* 5, 451-455
- Bossinger, O., & Schierenberg, E. (1992): Transfer and tissue specific accumulation of cytoplasmic components in embryos of *C. elegans* and *R. dolichura* in vivo analysis with a low-cost signal enhancement device. *Development* 114, 317-330
- Bossinger, O., Schierenberg, E. (1996 a): The use of fluorescent marker dyes for studying intercellular communication in nematode embryos. *Intern J Dev Biol* 40, 431-439
- Bossinger, O., Schierenberg, E. (1996 b): Early embryonic induction in *C. elegans* can be inhibited with polysulfated hydrocarbon dyes. *Dev Biol* 176, 17-21
- Boström, S. (1989): The taxonomic position of some teratocephalid nematodes - a scanning electron microscope study. *Revue de Nématologie* 12, 181-190
- Boström, S., Holovachov, O., Susulovsky, A. (2000): Study of Teratocephalidae (Nematoda) from the Ukraine. Description of a population of *Teratocephalus* de Man, 1876 with a compendium on species from the "lirellus-group". *Russian Journal of Nematology* 8, 139-145
- Boveri, T. (1887): Über die Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *Ascaris megalocephala*. *Anat Anzeiger* 2, 668-693
- Boveri, T. (1892): Über die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und somatischen Zellen bei *Ascaris megalocephala*. *Sitzber Ges Morph Physiol* 8, 114-125
- Boveri, T. (1899): Die Entwicklung von *Ascaris megalocephala* mit besonderer Rücksicht auf die Kernverhältnisse. In *Festschrift für C. v. Kupffer*. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 383-430
- Boveri, T. (1910): Die Potenzen der *Ascaris*-Blastomeren bei abgeänderter Furchung. Zugleich ein Beitrag zur Frage qualitativ ungleicher Chromosomenteilung. In: *Festschrift für R. Hertwig*, Vol 3, Fischer Verlag, Jena
- Bowerman, B., Tax, F. E., Thomas, J. H., Priess, J. R. (1992): Cell interactions involved in development of the bilaterally symmetrical intestinal valve cells during embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 116, 1113-1122
- Brenner, S. (1974): The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94
- Boardman, E. T. (1933): A comparative study of the behaviour of the preparasitic larvae of four bursate nematodes. Unpublished dissertation, Welch Medical Library, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA
- Bryant, V. (1973): The Life Cycle of *Nematospiroides dubius*, Baylis, 1926 (Nematoda: Heligmosomidae). *Journal of Helminthology*, Vol XLVII, No. 3, 1973, 263-268
- Calarco, P. G. (2000): Centrosome precursors in the acentriolar mouse oocyte. *Microsc Res Tech* 49, 428-434

- Capó, V. A., Despommier, D. D., Polvere, R. I. (1998): *Trichinella spiralis*: vascular endothelial growth factor is up-regulated within the nurse cell during the early phase of its formation. *J Parasitol* 84, 209-14
- Chitwood, B. G. (1930): The structure of the esophagus in the Trichuroidea. *J Parasitol* 17, 35-42
- Chitwood, B. G. (1937): A revised classification of the Nematoda. In: Anonymous, editor. Papers on helminthology, 30 year jubileum K. J. Skrjabin. Moscow, Russia: All-Union Lenin Academy of Agricultural Sciences, 67-69
- Chitwood, B. G. & Chitwood, M. B. (1933): The characters of a protonematode. *J Parasitol* 20, 130
- Chitwood, B. G. & Chitwood, M. B. (1950): An Introduction to nematology. University Park Press, Baltimore
- Cole, T. S. & Schierenberg, E. (1986): Laser microbeam-induced fixation for electromicroscopy: Visualisation of transient developmental features in nematode embryos. *Experientia* 42, 1046-1048
- Cole, C. J. & Townsend, C. R. (1990): Parthenogenetic lizards as vertebrate systems. *J Exp Zool Suppl* 4, 174-176
- Cowan, C. R. & Hyman, A. A. (2004): Centrosomes direct cell polarity independently of microtubule assembly in *C. elegans* embryos. *Nature* 431, 92-96
- Cross, J. H. Jr. (1960): The natural resistance of the white rat to *Nematospiroides dubius* and the effect of cortisone on this resistance. *J Parasitol* 46, 175-185
- Cypess, R. H., Pratt, E. A., Van Zandt, P. (1973): Rapid Exsheathment of *Nematospiroides dubius* infective Larvae. *The Journal of Parasitology*, Vol. 59, No. 2, April 1973, 247-250
- Czihak, G., Langer, H. & Ziegler, H. (eds) (1992): *Biologie*. 5. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg
- De Connick, L. (1965): Systématique des nématodes. In: Grassé, P. P. (Ed) *Traité de Zoologie*. Vol 4 (2) Némathelminthes. Paris, Masson & Chile, 586-681
- Delattre, M. & Gönczy, P. (2004): The arithmetic of centrosome biogenesis. *J Cell Sci* 117, 1619-1630
- De Ley, P. (2006): A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny (January 25, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.41.1, <http://www.wormbook.org>.
- De Ley, P. & Blaxter, M. L. (2002): Systematic Position and Phylogeny. In: D.L. Lee (ed.) *The Biology of Nematodes*. Taylor and Francis, London: 1-30
- Denich, K. T. R., Schierenberg, E., Isnenghi, E., Cassada, R. (1984): Cell-lineage and developmental defects of temperature-sensitive embryonic arrest mutants of the nematode *C. elegans*. *Roux's Arch Dev Biol* 193, 164-179

- Deppe, U., Schierenberg, E., Cole, T., Krieg, C., Schmitt, D., Yoder, B., von Ehrenstein, G. (1978): Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci USA 75, 376-80
- Despommier, D. D. (1975): Adaptive changes in muscles fibres infected with *Trichinella spiralis*. American Journal of Pathology 78, 477-496
- Despommier, D. D. & Müller, M. (1976): The stichosome and its secretion granules in the mature muscle larva of *Trichinella spiralis*. The Journal of Parasitology, Vo. 62, No. 5, October 1976, 775-785
- Despommier, D. D. (1993): *Trichinella spiralis* and the concept of niche. J Parasitol, 79 (4), 472-82
- Despommier, D. D. & Chen, S. X. (2004) <http://www.trichinella.org> (Stand Juli, 2006)
- Dobson, C. (1960): An investigation of the host-parasite relations and host specificity of *Nematospiroides dubius*, Baylis, 1926, Heligmosomidae, a mouse nematode in its normal and abnormal host. Ph.D. Thesis, University of Sheffield
- Dolinski, C., Baldwin, J. G. & Thomas, W. K. (2001): Comparative survey of early embryogenesis of Sercernentea (Nematoda), with phylogenetic implications. Can J Zool 79, 82-94
- Dorris, M, De Ley, P, Blaxter, M. L. (1999): Molecular Analysis of Nematode Diversity and the Evolution of Parasitism. Parasitol Today, May 1999, 15 (5), 188-93
- Drozдовskii, E. M. (1978): Characteristics of the structure and formation of preblastula as an index of phylogenetic relationships and taxonomic position of different nematode groups. Fitogelmintologicheskie Issledovania, 14-31 (in Russian)
- Drozдовskii, E. M. (1981): On the position of Chromadorids in the system of nematodes In: Evolution, morphology and ecology of free-living nematodes (Platonova TA, Tsalolikhin SY, eds). Academy of Sciences of the USSR, Leningrad, pp 32-37 (in Russian)
- Eckert, J., Friedhoff, K. T., Zahner, H., Deplazes, P. (2004): Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin (Enke) -Medizinverlage Stuttgart 2004
- Edgar, L. G. (1995): Blastomere culture and analysis. In: Methods in Cell Biology, Vol 48: *Caenorhabditis elegans*: Modern Biological Analysis of an organism. H. F. Epstein & D. C. Shakes (eds). Academic Press, San Diego, 303-321
- Ehrenford, F. A. (1954): The life cycle of *Nematospiroides dubius*. Baylis (Nematoda; Heligmosomidae). J Parasit. 40, 480-481
- Eroshenko, A. S. (1973): New data on the taxonomy of the family Teratocephalidae Andrassy (Nematoda). Zool Zh, 52, 1768-1776 (in Russian)
- Eyualet, A., Karegar, A., Nabil, H., De Ley, P. (1998): A redescription and ultrastructural study of *Diploscapter coronatus* (Cobb, 1893) Cobb, 1913 from Ethiopia and Iran. Russian Journal of Nematology 6, 17-22
- Fahmy, M. A. M. (1954): An investigation on the life cycle of *Trichuris muris*. Parasitol, 44, 50-57

- Fahmy, M. A. M. (1956): An investigation on the life cycle of *Nematospiroides dubius* (Nematoda: Heligmosomidae) with special reference to the free-living stages. Z. ParasitKde, 17, 393-399
- Gerlach, S. A., Riemann, F. (1973): The Bremerhaven checklist of the aquatic nematodes. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. Suppl., 4, 1-404
- Goldstein, B. (1992): Induction of gut in *Caenorhabditis elegans* embryos. Nature 357, 255-257
- Goldstein, B. (1993): Establishment of gut fate in the E lineage of *C. elegans*: the roles of lineage-dependent mechanisms and cell interactions. Development 118, 1267-77
- Goldstein, B. (1995): Cell contacts orient some cell division axes in the *Caenorhabditis elegans* embryo. J Cell Biol 129,1071-80
- Goldstein, B. & Hird, S. N. (1996): Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. Development 122: 1467-1474
- Goldstein, B., Frisse, L. M., Thomas, W. K. (1998): Embryonic axis specification in nematodes: evolution of the first step in development. Curr Biol 8, 157-160
- Goodey, J. B. (1963): Soil and freshwater nematodes. 2 nd ed rev J. B. Goodey, London, Methuen & Co., XVI + 544 p
- Gould, S. J. (2002): The Structure of Evolutionary Theory . The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, USA
- Greenstein, D. (2005): Control of oocyte meiotic maturation and fertilization (December 28, 2005), WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.53.1, <http://www.wormbook.org>
- Hajnal, A. & Berset, T. (2002): The *C. elegans* MAPK phosphatase LIP-1 is required for the G(2)M meiotic arrest of developing oocytes. Embo J 21, 4317-4326
- Haley, A. J. (1961): Biology of the rat nematode *Nippostrongylus brasiliensis* (Travassos, 1914). II. Preparasitic stages and development in the laboratory rat. Journal of Parasitology 47, 727-732
- Harder, A., Danneschewski, A, Wunderlich, F. (1995): Egg deposition of the intestinal nematode *Heterakis spumosa*: stimulation by soluble colon factors of mice. J Parasitol. 81(5), 733-735
- Hertwig, P. (1922): Beobachtungen über die Fortpflanzungsweise und die systematische Einteilung der Regenwurm-nematoden. Zeitschr für Zool 119, 539-558
- Holovachov, O., Boström, S., Tandingan De Ley, I., De Ley, P., Coomans, A. (2003): Morphology and systematics of the genera *Wilsonema* Cobb, 1913, *Ereptonema* Anderson, 1966 and *Neotylocephalus* Ali, Farooqui & Tejpal, 1969 (Leptolaimina: Wilsonematinae). Journal of Nematode Morphology and Systematics 5, 73-106
- Holovachov, O., Boström, S., Mundo-Ovampo, M. (2004 a): Description of three known and two new species of the genus *Tylocephalus* Crossman, 1933 with a revised

- taxonomy of the genus and key to species of the subfamily Wilsonematinae (Plectida). *Russian Journal of Nematology* 12, 115-130
- Holovachov, O., Boström, S., Winiszewska, G., Hánel, L. (2004 b): Description of two known and one new species of the genus *Anaplectus* De Coninck & Schuurmans Stekhoven, 1933 (Nematoda: Plectida) from Europe, and a revised taxonomy of the genus. *Russian Journal of Nematology* 12, 45-58
- Holovachov, O. (2006): Morphology and systematics of the order Plectida Malakhov, 1982 (Nematoda). Ph. D. Thesis, Wageningen University and Research Centre, the Netherlands
- Holterman, M., van der Wurff, A., van den Elsen, S., van Meghen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., Helder, J. (2006). Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1792-1800
- Houthoofd, W., Willems, M., Vangestel, S., Mertens, C., Bert, W., Borgonie, G. (2006): Different roads to form the same gut in nematodes. *Evol Dev* 8, 362-369
- Houthoofd, W., Jacobsen, K., Mertens, C., Vangestel, S., Coomans, A., Borgonie, G. (2003): Embryonic cell lineage of the marine nematode *Pellioiditis marina*. *Dev Biol.* 258, 57-69
- Hyman, A. A. (1989): Centrosome movement in the early divisions of *Caenorhabditis elegans*: a cortical site determining centrosome position. *J Cell Biol* 109, 1185-93
- Hyman, A. A. & White, J. G. (1987): Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 105, 2123-2135
- Hutter, H. & Schnabel, R. (1995 a): Specification of anterior-posterior differences within the AB lineage in the *C. elegans* embryo: a polarising induction. *Development* 121, 1559-68
- Hutter, H. & Schnabel, R. (1995 b): Establishment of left-right asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* embryo: a multistep process involving a series of inductive events. *Development* 121, 3417-24
- Johnson, G. D. & de Nogueira Araujo C. (1981): A simple method of reducing the fading immunofluorescence during microscopy. *J Immunological Methods* 43, 349-350
- Junkersdorf, B. & Schierenberg, E. (1992): Embryogenesis in *C. elegans* after elimination of individual blastomeres or induced alteration of the cell-division order. *Roux's Arch Dev Biol* 202, 17-22
- Kallenbach, R. J. (1983): The induction of de novo centrioles in sea urchin eggs: a possible common mechanism for centriolar activation among parthenogenetic procedures. *Eur J Cell Biol* 30, 159-166
- Karegar, A., De Ley, P., Geraert, E. (1997): Three teratocephalid nematodes from Iran. *Fundamental and Applied Nematology* 20, 459-471

- Kassai, T. (1982): Handbook of *Nippostrongylus brasiliensis* (Nematode). Commonwealth Agricultural Bureaux, Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary
- Kimble, J. & Hirsh, D. (1979): The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 70, 396-417
- Kimble, J. E. & White, J. G. (1981): On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 81, 208-219
- Ko, R. C., Fan, L., Lee, D. L., Compton, H. (1994) Changes in host muscles induced by excretory/secretory products of larval *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. Parasitology 108, 195–205
- Kozek, W. J. (1975): *Trichinella spiralis*: Morphological Characteristics of Male and Female Intestine-Infecting Larvae. Experimental Parasitology 37, 380-387
- Krieg, C., Cole, T., Deppe, U., Schierenberg, E., Schmitt, D., Yoder, B., von Ehrenstein, G. (1978): The cellular anatomy of embryos of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Analysis and reconstruction of serial section electron micrographs. Dev Biol 65, 193-215
- Krüger, E. (1913): Fortpflanzung und Keimzellbildung von *Rhabditis aberrans*, nov. sp. Zeitschrift für Parasitenkunde 105, 87-123
- Kutzowitz, M. (1993): Allgemeine Untersuchungen an den freilebenden Nematoden der Familie Cephalobidae. Diplomarbeit, Zoologisches Institut der Universität zu Köln
- Laufer, J. S., Bazzicalupo, P., Wood, W. B. (1980): Segregation of developmental potential in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. Cell, 569-77
- Lahl, V., Halama, C. Schierenberg, E. (2003): Comparative and experimental embryogenesis of Plectidae (Nematoda). Dev. Genes Evol 213,18-27
- Lahl, V., Sadler, B. & Schierenberg, E. (2006): Egg development in parthenogenetic nematodes: Variations in meiosis and axis formation. Int J Dev Biol 50, 393-397
- Lee, T. D. G. & Wright, K. A. (1978): The morphology of the attachment and probable feeding site of the nematode *Trichuris muris* (Schränk, 1788) Hall, 1916. Canadian Journal of Zoology, 56, 1889-1905
- Lee, J. Y. & Goldstein, B. (2003): Mechanisms of cell positioning during *C. elegans* gastrulation. Development 130, 307-20
- Lee, D. L., Ko, R. C., Yi, X. Y., Yeung, M. H. F (1991) *Trichinella spiralis*: antigenic epitopes from the stichocytes detected in the hypertrophic nuclei and cytoplasm of the parasitized muscle fibre (nurse cell) of the host. Parasitology 102, 117-123
- Lorenzen, S. (1981): Entwurf eines phylogenetischen Systems der freilebenden Nematoden. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. Suppl., 7, 1-472
- Lorenzen, S. (1983): Phylogenetic systematics: Problems, achievements and its application to the Nematoda. In: Stone, A. R., Platt, H. M., Khalil, L. F. (Eds). Concepts in nematode systematics. London, New, York & Paris, Academic Press, 11-23

- Lorenzen, S. (1994): The Phylogenetic Systematics of Free-Living Nematodes. The Ray Society, London
- Lucker, J. T. (1936): Preparasitic moults in *Nippostrongylus muris*, with remarks on the structure of the cuticula of trichostrongyles. *Parasitology* 28, 161-171
- Maggenti, A. R. (1961): Morphology and biology of the genus *Plectus* (Nematoda: Plectidae). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 28, 118-130
- Maggenti, A. R. (1963): Comparative morphology in nemic phylogeny. In: Dougherty, E. C. (Ed.). *The lower Metazoa comparative biology and phylogeny*. Berkeley & Los Angeles, Univ. California Press. London, Cambridge Univ. Press, 273-282
- Malakhov, V. V. (1994): Nematodes. Structure, Development, Classification and Phylogeny. Smithsonian Institution Press, Washington
- Malakhov, V. V. (1998): Embryological and histological peculiarities of the order Enoplida, a primitive group of nematodes. *Russian Journal of Nematology* 6, 41-46
- Malakhov, V. V., Romashov, B. Y., Spiridonov, S. E. (1984): Embryonic development of *Trichocephalus trichiurus* and *Eucoleus oesophagicola* (Nematoda, Trichocephalida), *Parasitologica*, Vol 18, N 4, 280-286 (in Russ.)
- Manandhar, G., Sutovsky, P., Joshi, H. C., Stearns, T. & Schatten, G. (1998): Centrosome reduction during mouse spermiogenesis. *Dev Bio* 203, 424-434
- Maupas, E. (1900): Modes et Formes de Reproduction des Nématodes. *Arch de Zool Exp et Gén* 3, 464-618
- Mehlhorn, H. & Piekarski, G. (2002): *Grundriß der Parasitenkunde*. 6. Auflage, Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg
- Miller, M. A., Nguyen, V. Q., Lee, M.-H., Kosinski, M., Schedl, T., Caprioli, R. M. & Greenstein, D. (2001): A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science* 291, 2144-2147
- Mittwoch, U. (1978): Parthenogenesis. *J Med Gen* 15, 165-181
- Müller, H. (1903): Beitrag zur Embryonalentwicklung der *Ascaris megalocephala*. *Zoologica* 41, 1-30
- Müller, F. & Tobler, H. (2000): Chromatin diminution in the parasitic nematodes *Ascaris suum* and *Parascaris univalens*. *Int J Parasitol* 30, 391-399
- Müller, W. A. & Hassel, M. (2003): *Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie von Mensch und Tieren*. 3. Auflage, Springer New York, Heidelberg, Berlin 2003
- Murau, R. (1975): Effects of temperature on hatching and development of *Nematospiroides dubius* in aerated water. *Journal of Helminthology*, 49, 293-296
- Nance, J. & Priess, J. R. (2002): Cell polarity and gastrulation in *C. elegans*. *Development* 129, 387-97
- Nance, J., Munro, E. M., Priess, J. R. (2003): *C. elegans* PAR-3 and PAR-6 are required for apicobasal asymmetries associated with cell adhesion and gastrulation. *Development* 130, 5339-50
- National library of medicine 2006 <http://www.nlm.nih.gov/mesh/2006/MBrowser.html>

National center for biotechnology information 2006

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6338>

Nigon, V., Guerrier, P. & Monin, H. (1960): L'architecture polaire de l'oeuf et les mouvements des constituents cellulaire au cours des premières étapes du développement chez quelques nématodes. Bull. Biol. Fr. Belg. 94, 131-202

Nguyen 2006 <http://kbn.ifas.ufl.edu/cephalob/cephfig41.gif> Stand Juli 2006

Okamoto, H. & Thomson, J. N. (1985): Monoclonal antibodies which distinguish certain classes of neuronal and support cells in the nervous tissue of the nematode *C. elegans*. J Neurosci 5, 643-653

Panesar, T. S. & Croll, N. (1980): The hatching process in *Trichuris muris* (Nematoda: Trichuroidea). Can J Zool 59, 621-628

Pearse, A. S. (1942): An Introduction to Parasitology. C C Thomas Publishers, Baltimore

Powell-Coffman, J. A., Knight, J., Wood, J. B. (1996): Onset of *C. elegans* gastrulation is blocked by inhibition of embryonic transcription with an RNA polymerase antisense RNA. Dev Biol 178, 472-483

Preston, C. M. & Jenkins, T. (1982): Ultrastructural studies of early stages of oogenesis in a trichuroid nematode, *Trichuris muris*. Int J Invertebr Repro 6, 77-91

Preston, C. M. & Jenkins, T. (1985): *Trichuris muris*: structure and formation of the egg polar plugs. Z Parasitenkd, 71 (3), 373-81

Priess, J. R. & Thomson, J. N. (1987): Cellular interactions in early *C. elegans* embryos. Cell 48, 241-250

Purkerson, M. & Despommier, D. D. (1974): Fine structure of the muscle phase of *Trichinella spiralis* in the mouse. In: Kim, C. (ed.), Trichinellosis. Intext Publishers, New York

Raff, R. A. (1996): The Shape of Life. The University of Chicago Press, Chicago, USA

Raff, R. A. (2000): Evo-devo: the evolution of a new discipline. Nat Rev Genet 1, 74-79

Riparbelli, M. G. & Callaini, G. (2003): *Drosophila* parthenogenesis: a model for de novo centrosome assembly. Dev Biol 260, 298-313

Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., Gerdes, H. H. (2004): Nanotubular highways for intercellular organelle transport. Science 303, 1007-10

Sadler, B. (2000): Untersuchungen zur Entwicklung von Nematoden der Familie Cephalobidae: Meiose, Eiaktivierung und frühe Furchung. Schriftliche Hausarbeit

Sadler, P. L. & Shakes, D. C. (2000): Anucleate *Caenorhabditis elegans* sperm can crawl, fertilize oocytes and direct anterior-posterior polarization of the 1-cell embryo. Development 127 (2), 355-366

Seydoux, G. & Schedl, T. (2001): The germline in *C. elegans*: origins, proliferation, and silencing. Int Rev Cytol 203, 139-185

- Schatten, H., Schatten, G., Mazia, D., Balzon, R., Simerly, C. (1986): Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 105-109
- Schatten, H., Walter, M., Biessmann, H., Schatten, G. (1992): Activation of maternal centrosomes in unfertilized sea urchin eggs. *Cell Motil Cytoskeleton* 23, 61-70
- Schierenberg, E. (1978): Die Embryonalentwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* als Modell. Dissertation an der Universität Göttingen
- Schierenberg, E. (1987 a): Vom Ei zum Organismus. Die Embryonalentwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. *BIZ* 17, 1987, Nr. 4
- Schierenberg, E. (1987 b): Reversal of cellular polarity and early cell-cell interaction in the embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 122, 452-63
- Schierenberg, E. (1997 a): Nematodes: the roundworms. In: *Embryology. Constructing the Organism*, Gilbert, S. F. & Raunio, A. M. (eds) (Sunderland, MA: Sinauer Associates), pp. 131-147
- Schierenberg, E. (1997 b): Spezifikation des Zellschicksals im frühen Embryo von *Caenorhabditis elegans*. *Naturwissenschaften* 84, 55-64
- Schierenberg, E. (2001): Three sons of fortune: early embryogenesis, evolution and ecology of nematodes. *Bio Essays* 23, 841-847
- Schierenberg, E. (2005): Unusual cleavage and gastrulation in a freshwater nematode: developmental and phylogenetic implications. *Dev Genes Evol* 215, 103-108
- Schierenberg, E. (2006): Embryological variation during nematode development. (January 02, 2006), *Wormbook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.55.1, <http://www.wormbook.org>.
- Schierenberg, E. & Wood, W. B. (1985): Control of cell-cycle timing in early embryos of *C. elegans*. *Devl Biol* 107, 337-354
- Schierenberg, E. & Cassada, R. (1986): Der Nematode *Caenorhabditis elegans* – ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus. *BIZ* 16, 1986, Nr. 1
- Schierenberg, E. & Lahl, V. (2004): Embryology and phylogeny of nematodes. In: Cook, R. C., Hunt, D. J. (eds.) *Nematology Monographs & Perspectives*, Vol. 2, Brill, Leiden, 667-679
- Schierenberg, E., Carlson, C., Sidio, W. (1984): Cellular development of a nematode: 3-D computer reconstruction of living embryos. *Roux's Arch Dev Biol* 194, 61-68
- Schierenberg, E., Wiegner, O., Bossinger, O., Skiba, F., Kutzowitz, M. (1997/98): Pattern formation and cell specification in nematode embryos: A theme with considerable variations. *Zoology* 100, 320-327
- Schlicht, P. & Schierenberg, E. (1991): Altered establishment of cell lineages in the *Caenorhabditis elegans* embryo after suppression of the first cleavage supports a concentration dependent decision mechanism. *Roux's Arch Dev Biol* 199, 437-448

- Schnabel, R. (1994): Autonomy and nonautonomy in cell fate specification of muscle in the *Caenorhabditis elegans* embryo: a reciprocal induction. *Science* 263, 1449-52
- Schnabel, R. (1995): Duels without obvious sense: counteracting inductions involved in body wall muscle development in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Development* 121, 2219-32
- Schnabel, R. & Priess, J. R. (1997): Specification of cell fates in the early embryo. In: Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J. & Priess, J. R. (eds). *C. elegans* II. Cold Spring Harbor, NY, USA, Cold Spring Harbor Press, 1222 pp
- Schwartz, B & Alicata, J. E. (1934): The development of the trichostrongyle, *Nippostrongylus muris*, in rats following ingestion of larvae. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 24, 334-338
- Sheffield, H. G. (1963): Electron microscopy of the bacillary band and stichosome of *Trichuris muris* and *T. vulpis*. *J Parasitol* 49, 998-1009
- Shikhobalova 1937 Shikhobalova, N. P. (1937): Experimental study of the chemotherapy of trichocephalosis. I. Trichocephalosis of white mice. *Medskya Parazit*, 6, 389-400
- Shmytova, G. Y. (1971): The embryonic and postembryonic development of nematodes of the genus *Trichuris* (in Russian). *Trudi Gel'mintologicheskoi Laboratorii Voprosy Biologii Fiziologii i Biokhimii Gel'mintov Zhivotnykh i. Rastenii* 21, 157-166
- Siewing, R. (Hrsg.) (1980): *Lehrbuch der Zoologie. Band I Allgemeine Zoologie. 3. Auflage*, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York.
- Skiba, F. (1990): Vergleichende embryologische Untersuchungen an freilebenden Nematoden: Zellstammbäume und Ausbildung von räumlichen und zeitlichen Mustern. Diplomarbeit, Zoologisches Institut der Universität zu Köln.
- Skiba, F. & Schierenberg, E. (1992): Cell-Lineages, Developmental Timing and Spatial Formation in Embryos of Free Living Soil Nematodes. *Dev Biol* 151, 597-610
- Smith, P. E. (1953): Life history and host-parasite relations of *Heterakis spumosa*, a nematode parasite in the colon of the rat. *Am J Hyg* 57 (2), 194-221
- Sommerville, R. I. & Bailey, M. A. (1973): *Nematospiroides dubius*: Exsheathment of Infective Juveniles. *Experimental Parasitology* 33, 1-9
- Spieler, M. & Schierenberg, E. (1995): On the development of the alternating freeliving and parasitic generations of the nematode *Rhabdias bufonis*. *Invertebr Reprod Dev* 28, 193-203
- Spurlock, G. M. (1943): Observations on host-parasite relations between laboratory mice and *Nematospiroides dubius*, Baylis. *J Parasit*, 29, 303-311
- Stouthamer, R., Luck, R. F., Hamilton, W. D. (1990): Antibiotics cause parthenogenetic Trichogramma (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 2424-2427
- Strome, S. & Wood, W. B. (1983): Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Cell* 35, 15-25

- Strome, S. (1986): Asymmetric movements of cytoplasmic components in *C. elegans* zygotes. *J Embryol exp Morph* 97 Suppl, 15-29
- Strome, S., Garvin, C., Paulsen, J., Capowski, E., Martin, P. & Beanan, M. (1994): Specification and development of the germline in *Caenorhabditis elegans*. *Ciba Found. Symp.* 182, 31–45
- Sulston, J. E. & Horvitz, H. R. (1977): Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56 (1), 110-56
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., Thomson, J. N. (1983): The embryonic cell lineage of the nematode *C. elegans*. *Dev Biol* 100, 64-119
- Szöllosi, D. & Ozil, J. P. (1991): De novo formation of centrioles in parthenogenetically activated, diploidized rabbit embryos. *Biol Cell* 72, 61-66
- Tahseen, Q., Jairajpuri, M. S., Amad, I. (1991): Observations on the embryonic and postembryonic development of *Diploscapter orientalis* (Nematoda: Rhabditida). *Revue Nematol.* 14, 251-260
- Tahseen, Q., Ahmad, I., Jairajpuri, M. S. (1992): Description and developmental biology of *Plectus zelli* n. sp. (Nematoda: Araeolaimida. *Fundamental and applied Nematology* 15, 503-510
- Thomas, H. (1965): Beiträge zur Biologie und mikroskopischen Anatomie von *Trichinella spiralis* Owen 1835. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie* 16, 148-180
- Traunspurger, W. (2002): Nematoda. In: Rundle, S. D., Robertson, A. L., Schmid-Araya, J. M. (eds). *Freshwater meiofauna: biology and ecology*. Backhuys, Leiden, 63-104
- Twohy, D. W. (1956): The early migration and growth of *Nippostrongylus muris* in the rat. *American Journal of Hygiene* 63, 165-185
- Villella, J. B. (1970): Life cycle and morphology, in: Gould, S. E. (ed). *Trichinosis in Man and Animals*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 19-60
- Viney, M. (1999): Exploiting the life cycle of *Strongyloides ratti*. *Parasitol Today* 15, 231-235
- von Ehrenstein, G. & Schierenberg, E. (1980): Cell lineages and development of *C. elegans* and other nematodes. In: Zuckerman, B. M. (ed). *Nematodes as Biological Models, Volume 1: Behavioral and Developmental Models*. Academic Press, NY. 1: 1-72
- Voronov, D. A. (1999): The embryonic development of *Pontonema vulgare* (Enoplida: Oncholaimidae) with discussion of nematode phylogeny. *Russ J Nematol* 7, 105-114
- Voronov, D. A. (2001): Comparative embryology of nematodes and the law of embryo similarity. *Zh Obshch Biol* 62, 34-48
- Voronov, D. A. & Panchin, Y. V. (1998): Cell lineage in marine nematode *Enoplus brevis*. *Development* 125, 143-150

- Voronov, D. A., Panchin, Y. V. & Spiridonov, S. E. (1998): Nematode phylogeny and embryology. *Nature* 395, 28
- Wallenfang, M. R. & Seydoux, G. (2000): Polarization of the anterior-posterior axis of *C. elegans* is a microtubule-directed process. *Nature* 408, 89-92
- Wakelin, D. (1969): The development of the early larval stages of *Trichuris muris* in the albino laboratory mouse. *J Helminthol* 43, 427-436
- Weinstein, P. P. & Jones, M. F. (1956): The in vitro cultivation of *Nippostrongylus muris* to the adult stage. *Journal of Parasitology* 43, 215-231
- Weinstein, P. P., Newton, W. L., Sawyer, T. K., Sommerville, R. I. (1969): *Nematospiroides dubius*: Development and passage in the germfree mouse, and a comparative study of the free-living stages in germfree feces and conventional cultures. *Tr Am Micr Soc* 88, 95-117
- Went, D. F. & Krause, G. (1973): Normal development of mechanically activated, unlaidd eggs of an endoparasitic hymenopteran. *Nature* 244, 454-455
- Went, D. F. & Krause, G. (1974 a): Alteration of egg architecture and egg activation in an endoparasitic Hymenopteran as a result of natural or imitated oviposition. *Wilhelm Roux's Archives* 180, 257-286
- Went, D. F. & Krause, G. (1974 b): Egg activation in *Pimpla turionellae* (Hym.). *Naturwissenschaften* 61, 407-8
- Went, D. F. (1982): Egg activation and parthenogenetic reproduction in insects. *Biol Rev* 57, 319-339
- Wiegner, O. (1998): Zellkommunikation und Zellspezifikation im Nematodenembryo. Untersuchungen an *Caenorhabditis elegans* und *Acrobeloides nanus*. Dissertation an der Universität zu Köln
- Wiegner, O. & Schierenberg, E. (1998): Specification of gut cell fate differs significantly between the nematodes *Acrobeloides nanus* and *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 204, 3-14
- Wiegner, O. & Schierenberg, E. (1999): Regulative Development in a nematode embryo: A Hierarchy of cell fate transformations. *Developmental Biology* 215, 1-12
- Winfield, G. F. (1933): Quantitative experimental studies on the rat nematode *Heterakis spumosa*. *SCHNEIDER 1866. Amer J Hyg* 17, 168-228
- Wolf, R. & Wolf, D. (1988): Activation by calcium ionophore injection into unfertilized ovarian eggs explanted from *Pimpla turionellae* (Hymenopteran). *Zool Jb Physiol* 92, 501-512
- Wood, W. B. (1988): The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory
- Wright, K. A. & Chan, J. (1973): Sense receptors in the bacillary band of trichuroid nematodes. *Tiss Cell* 5, 373-380
- Wright, K. A. (1989): Parasites in peril – the trichuroid nematodes. In: Ko, R. (ed.), *Current Concepts in Parasitology*, Hong Kong University Press, Hong Kong, 65-80

- Yasuraoka, K & Weinstein, P. P. (1969): Effects of temperature on the development of eggs of *Nematospiroides dubius* under axenic conditions relative to in vitro cultivation. The Journal of Parasitology Vol. 55, No. 1 February 1969, 44-50
- Yokogawa, S. (1922): The development of *Heligmosomum muris* Yokogawa, a nematode from the intestine of the wild rat. Parasitology 14, 127-166
- Zchori-Fein, E., Roush, R. T., Hunter, M. S. (1991): Male production induced by antibiotic treatment in *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae), an asexual species. Experientia 48, 102-105
- Zell, H. (1993): Thema: Taxonomie und Phylogenie von Nematoden. Die Gattung *Plectus* Bastian, 1865 sensu lato (Nematoda, Plectidae) – Ein Beitrag zu Ökologie, Biogeographie, Phylogenie und Taxonomie der Plectidae. Andrias 11
- zur Strassen, O. (1896): Embryonalentwicklung der *Ascaris megalocephala*. Arch Entwicklungsmech 3, 27-105

13 Anhang

13.1 Liste der verwendeten Spezies

Bei in Anführungsstriche gesetzten Bezeichnungen handelt es sich um laborinterne Namen.

„Acrobeloides herma“, „Herma-1“, PS 1146 = verschiedene Bezeichnungen für einen hermaphroditischen Acrobeloiden

Acrobeloides nanus

Caenorhabditis elegans

Diploscapter coronatus

Heterakis spumosa

Nematospiroides dubius (= *Heligmosomoides polygyrus*)

Nippostrongylus brasiliensis (= *Heligmosomum muris*, *Nippostrongylus muris*)

Protorhabditis sp.

Rhabditis sp. = laborinterne Bezeichnung Thrinax

Teratocephalus lirellus

Trichinella spiralis

Trichuris muris (= *Trichocephalus muris*)

Plectiden:

- Genus *Plectus*:

Plectus acuminatus

Plectus aquatilis

„Plectus mekong“ = nicht klassifizierter Plectide aus Bodenproben des Mekong-Ufers

Plectus minimus

- Genus *Anaplectus*:

Anaplectus sp.

- Plectiden anderer Genera:

Tylocephalus auriculatus

Ereptonema arcticum

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Teilpublikationen

Vera Lahl, Christian Halama und Einhard Schierenberg (2003):

"Comparative and experimental embryogenesis of Plectidae (Nematoda)"

Dev. Genes Evol 213,18-27

Einhard Schierenberg und Vera Lahl (2004):

"Embryology and phylogeny of nematodes"

Cook, R.C. and Hunt, D.J. (eds.) Nematology Monographs & Perspectives, Vol. 2, Brill, Leiden, pp. 667-679

Vera Lahl, Bernd Sadler und Einhard Schierenberg (2006):

"Egg development in parthenogenetic nematodes: Variations in meiosis and axis formation"

Int. J. Dev. Biol. 50, 393-397

zur Veröffentlichung eingereicht:

Vera Lahl, Jens Schulze und Einhard Schierenberg: "Embryonic pattern formation in the nematode *Diploscapter coronatus*"

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde als externe Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe für Experimentelle Morphologie des Zoologischen Institut der Universität zu Köln, Kerpener Str. 15 angefertigt und dort von Prof. Dr. E. Schierenberg betreut.

Herrn Prof. Dr. H. Zahner möchte ich herzlich für die freundliche Übernahme des Referats und das stetige Interesse am Fortgang der Arbeit sowie seine Geduld danken.

Herrn Prof. Dr. E. Schierenberg danke ich für die interessante Aufgabenstellung. Seine Geduld, sein Vertrauen, die immerwährende Ansprechbarkeit und die freundschaftliche Unterstützung sowie die fachlichen Diskussionen haben mir stets als Motivation gedient.

Dr. A. Harder und Frau Moll vom Landwirtschaftszentrum Monheim der Bayer AG und Prof. Dr. H. Mehlhorn der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für die Überlassung der in meiner Arbeit verwendeten parasitären Spezies.

Ich danke allen Mitarbeitern und Angestellten des Zoologischen Instituts, Kerpener Str. 15, Köln für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die herzliche, familiäre Aufnahme in ihre Mitte. Ich habe mich sehr wohl bei ihnen gefühlt.

Meinem Bruder Dr. P. Lahl möchte ich für die Unterstützung beim Layout und das Überwinden der Fallstricke von Microsoft Word danken.

Bei meinem Ehemann Sven Ewald bedanke ich aufrichtig für die Hilfestellung beim Layout der Bilder, die geduldige Einführung in diverse Computerprogramme, nächtliche Diskussionen über die Parallelen von Würmern und Computerwürmern, die stetige Ermunterung zur Fertigstellung der Arbeit und unzählige Stunden als Babysitter unserer Tochter Johanna.

Meinen Eltern möchte ich für die Unterstützung danken, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere danke ich meiner Mutter fürs Korrekturlesen gemäß der neuen, deutschen Rechtschreibung und meinem Vater für die über lange Strecken allwöchentliche Frage: „Was machen die Würmer?“

Der Großteil der Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 572 (Commitment of cell arrays and cell type specification, Projektbereich B: Zelltypspezifizierung) angefertigt.